

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
JULIE BÉRUBÉ**

**INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT CELLULAIRE SUR L'ACTIVITÉ
DES PROTÉINES ANTIRÉTROVIRALES TRIM5 α ET TRIMCyp**

SEPTEMBRE 2011

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier mon directeur de laboratoire, le Dr Lionel Berthoux, pour son aide, sa patience, son soutien ainsi que pour son dévouement pour ses étudiants. Je le remercie également de m'avoir permis de travailler sur un projet fort intéressant.

Je désire aussi remercier tous les gens qui ont fait parti de ce laboratoire : Maxime Agbeci, Amélie Bouchard, Mélodie B. Plourde, Nadia Chandonnet, Vincent Guen, Delphine Guyot, Lolita Iranezereza, Marine Malbec, Aïda Morchid, Marie-Édith Nepveu-Traversy, Josée Pellerin, Quangtoan Pham et Yixin Yang.

Ensuite, il est important de souligner l'aide apportée par les différents laboratoires tant pour le prêt de matériels et d'équipements que pour leur intérêt envers mon projet : le laboratoire du Dr Éric Asselin, le laboratoire du Dr Michel Cyr, le laboratoire du Dr Guy Massicotte, le laboratoire du Dr Marc Sirois et le laboratoire du Dr Carlos Reyes-Moreno. Je remercie tout spécialement Mme Marie-Claude Déry d'avoir partagé son expertise de l'appareil à PCR en temps réel.

Finalement, je tiens à remercier deux bonnes amies, Marie-Édith Nepveu-Traversy ainsi qu'Amélie Bouchard d'avoir été là pour moi dans les bons et moins bons moments.

Merci à toutes et tous!

RÉSUMÉ

TRIM5 α et TRIMCyp sont des protéines antivirales de la famille TRIM5. Ce sont des protéines cytoplasmiques qui bloquent la réplication des rétrovirus peu après leur entrée dans la cellule (avant l'étape de transcription inverse). Par son interaction avec la capsid virale, TRIM5 α et TRIMCyp accélèrent la décapsidation du virus, inhibent son transport vers le noyau puis sensibilisent le rétrovirus à une dégradation par le protéasome. TRIM5 α conserve son activité inhibitrice dans les cellules autres que primates (par exemple les cellules de chats) après transfert de gènes. Cependant, il a été reporté que l'allèle Rhésus macaque de TRIM5 α n'inhibe pas le VIH dans les cellules canines d'ostéosarcome D17 (Saenz et al. 2005). Ceci suggère que l'environnement cellulaire est important pour le mécanisme de restriction par TRIM5 α . L'objectif principal de notre étude est donc de caractériser une lignée cellulaire dans laquelle TRIM5 α ne présente pas d'activité de restriction (cellule D17) en étudiant la protéine elle-même ainsi que son interaction avec le virus. Nos analyses montrent que d'autres allèles de TRIM5 α (humain et singe vert africain) ainsi que TRIMCyp sont également moins actifs dans ces cellules. Leur niveau d'expression, leur localisation cellulaire et leur temps de demi-vie sont normaux. Par contre, l'accélération de la décapsidation et l'inhibition de la synthèse d'ADNc viral causé par TRIM5 α et TRIMCyp sont diminuées dans les cellules D17. Le facteur de restriction murin Fv1 bloque la réplication rétroviral peu après l'entrée du virus dans la cellule. Celui-ci ne présente aucune similarité avec TRIM5 α et est fonctionnel dans les cellules D17 montrant que la perte d'activité de restriction est spécifique à TRIM5 α et TRIMCyp. Ces résultats suggèrent donc qu'un facteur nécessaire à la restriction par TRIM5 α et TRIMCyp est manquant dans les cellules D17 ou qu'un facteur présent dans les cellules D17 inhibe l'activité de restriction de TRIM5 α et TRIMCyp. Comme mentionné plus haut, TRIM5 α et TRIMCyp inhibent la réplication rétrovirale en accélérant la décapsidation du virus, en inhibant son transport vers le noyau et en sensibilisant le virus à une dégradation par le protéasome. Pour inhiber

la réplication rétrovirale, TRIM5 α interagit directement avec la capsid virale sous forme de multimères. L'utilisation de glutaraldéhyde, un agent formant des liaisons croisées entre protéines proches montrent que TRIM5 α forme des trimères. L'utilisation d'un inhibiteur de protéasome (MG132) montre que TRIM5 α semble séquestrer le virus dans les corps cytoplasmiques. Cependant, la présence de trimères ne semble pas expliquer la présence de corps cytoplasmiques. Le second objectif de cette étude était donc d'étudier la multimérisation de TRIM5 α et TRIMCyp pour la formation des corps cytoplasmiques ainsi que la séquestration du VIH-1 dans ces structures. Les résultats indiquent que la forme hexamérique est la forme la plus abondante des multimères. La multimérisation n'implique pas de ponts disulfures et n'est pas affectée par l'infection par un virus sensible à la restriction ou au traitement par les inhibiteurs MG132 et CsA (inhibiteur compétitif se liant à CypA et empêchant la liaison CypA/CA). De plus, la séquestration dans les corps cytoplasmiques du VIH-1 peut se produire en absence de restriction.

Mots clés : TRIM5 α , TRIMCyp, facteurs de restriction, rétrovirus, Virus de l'immunodéficience humaine et cellule canine D17

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	iii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	xii
 CHAPITRE 1	
INTRODUCTION	1
 1.1 Le Syndrome de l'immunodéficience acquise	1
1.2 Le virus de l'immunodéficience humaine.....	2
1.2.1 Carte génomique du VIH	2
1.2.2 Structure du virus.....	4
1.2.3 Cycle de réplication du VIH.....	6
1.3 Facteurs de restriction	9
1.3.1 APOBEC.....	10
1.3.1.1 Structure.....	10
1.3.1.2 Mécanisme d'action.....	11
1.3.2 Tetherin.....	13
1.3.2.1 Structure.....	14
1.3.2.2 Mécanisme d'action.....	14
1.3.3 Fv1	15
1.3.3.1 Mécanisme d'action de Fv1	16
1.3.4 La famille TRIM.....	16
1.3.4.1 Fonction des différents domaines de TRIM.....	18
1.3.4.2 Rôles biologiques des différents TRIM	19
1.3.5 TRIM5 α	20
1.3.5.1 Découverte de TRIM5 α	20
1.3.5.2 Structure détaillée et fonction des domaines de TRIM5 α	21
1.3.5.3 Les isoformes de TRIM5	22

1.3.5.4 Orthologues simiens de TRIM5 α et virus inhibés par ceux-ci	22
1.3.5.5 Localisation de TRIM5 α	24
1.3.5.6 La trimérisation de TRIM5 α	25
1.3.5.7 Dégradation et ubiquitination de TRIM5 α	26
1.3.5.8 Mécanisme d'action de TRIM5 α	27
1.3.5.9 Facteurs influençant la restriction par TRIM5 α	31
1.3.6 TRIMCyp	34
1.3.6.1 Comparaison de TRIM5 α et TRIMCyp	35
1.3.6.2 Nouveaux orthologues de TRIMCyp	36

CHAPITRE 2

ÉTUDE DU COMPORTEMENT DE TRIM5 α ET TRIMCyp DANS LES CELLULES CANINES D17

2.1 Problématique	37
2.2 Matériels utilisés	38
2.2.1 Souches bactériennes	38
2.2.2 Lignées cellulaires	38
2.2.3 Enzymes de restriction	39
2.2.4 Culture cellulaire	39
2.2.5 Les produits pharmaceutiques	39
2.3 Méthodes utilisées	39
2.3.1 Production des ADN _s plasmidiques	40
2.3.1.1 Culture bactérienne	40
2.3.1.2 Bactéries compétentes	40
2.3.1.3 Transformations bactériennes	40
2.3.1.4 Minipreps et Midipreps d'ADN	41
2.3.1.5 Plasmide utilisé	41
2.3.2 Production de virus	43
2.3.2.1 Virus pMIP-TRIM5 α -FLAG	43
2.3.2.2 Virus VIH-1 GFP	44
2.3.2.3 Transduction de cellules par le virus pMIP-TRIM5 α -FLAG	44

2.4 Résultats	45
Abstract.....	46
Background.....	47
Results.....	50
Discussion	54
Conclusions	55
Methods	55
Plasmid DNAs	55
Cells and virus production	56
TRIM5-expressing cell lines	57
Viral challenges	57
IF microscopy	57
Fate-of-capsid assay	58
Monitoring HIV-1 cDNA synthesis	59
Competing interests	60
Authors' contributions	60
Acknowledgements.....	60
References	61
Figure legends	67
Figures.....	70
2.5 Conclusions.....	78

CHAPITRE 3

ÉTUDE DE L'IMPLICATION DE MULTIMÈRES DE TRIM5A VIA LES CORPS CYTOPLASMIQUES DANS LA SÉQUESTRATION VIRALE..... 81

3.1 Problématique	81
3.2 Méthode	82
3.2.1 Multimérisation de TRIM5 α	82
3.2.2 Microscopie à immunofluorescence.....	82
3.3 Résultats	83
3.3.1 Multimérisation de TRIM5 α et de TRIMCyp.....	83
3.3.2 Séquestration dans les corps cytoplasmiques de TRIM5 α	87

3.4 Conclusions	90
BIBLIOGRAPHIE	92

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Répartition mondiale du SIDA en 2005	1
1.2 Carte génomique du VIH-1/VIH-2.....	3
1.3 Schéma représentant la structure du VIH.....	5
1.4 Structure conique du VIH	6
1.5 Processus d'attachement du VIH	7
1.6 Cycle de réplication du VIH	8
1.7 Structure de la famille APOBEC	11
1.8 Action antivirale d'APOBEC3G	13
1.9 Structure de la Tetherin	14
1.10 Mécanisme d'action de la Tetherin.....	15
1.11 Schéma des protéines TRIM identifiées.....	17
1.12 Schéma du motif RBCC de TRIM5 α hu.....	21
1.13 Liaisons possibles des trimères de TRIM5 α à la CA virale	26
1.14 Formes d'ADN _C rétrovirales produites après infection	30
1.15 Interaction entre CypA et la capsid du VIH-1	33
1.16 Structure de TRIMCyp.....	35
2.1 Restriction par TRIM5 α dans les cellules humaines et canines.....	37
2.2 Plasmide pMip	42
2.3 Production de virus pMIP-TRIM5 α	43
2.4 Production de lignées cellulaires exprimant TRIM5 α	44

2.5	Production d'hétérocaryons de cellules MDTF et D17	79
2.6	Possible stratégie de clonage d'un facteur manquant dans les cellules D17	80
3.1	Multimérisation de TRIM5 α et TRIMCyp	84-85
3.2	Multimérisation de TRIMCyp lorsque les cellules MDTFTRIMCyp sont infectées par le VIH-1	86
3.3	Effet du MG132 sur le patron de multimérisation de TRIMCyp	87
3.4	Effet du MG132 sur la colocalisation du VIH-1 et de TRIMCyp	88
3.5	Effet de la CsA et de la mutation H436Q sur la séquestration virale par TRIMCyp	89

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Protéines virales du VIH, tailles et fonctions (Levy 2007).....	4
1.2 Virus inhibés par les différents orthologues de TRIM5 α (Yap et al. 2004; Song et al. 2005c; Ohkura et al. 2006)	23

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
ARN	Acide ribonucléique
ADN	Acide désoxyribonucléique
SIV	Virus de l'immunodéficience simienne
Gag	Antigène du groupe
Pol	Polymérase
Env	Enveloppe
LTR	Long terminal repeat
CTD	Domaine C-terminal
NTD	Domaine N-terminal
ADN _c	ADN complémentaire
APOBEC	Apolipoprotein BmRNA-editing catalytic polypeptide
CD	Domaine catalytique
PCD	Domaine pseudocatalytique
C	Cytosine
U	Uracile
IFN	Interféron
MLV	Virus de la leucémie murine
TRIM	Motif Tripartite
EIAV	Virus de l'anémie infectieuse équine
GFP	Protéine fluorescente verte
CypA	Cyclophiline A
CsA	Cyclosporine A
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagle Medium"
SVF	Sérum de veau foetal
LB	Luria-Bertani
NEB	New england biolabs

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Le Syndrome de l'immunodéficience acquise

Le Syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) est le stade le plus avancé d'une maladie chronique dégénérative, attaquant le système immunitaire et rendant le sujet susceptible aux infections opportunistes et aux cancers (Santé Canada 2006). Actuellement pandémique, le SIDA sévit principalement en Afrique subsaharienne. En 2005, on dénombrait 40,3 millions de séropositifs, 4,9 millions de nouveaux cas et 3,1 millions de décès (figure 1.1) (Onusida 2005).

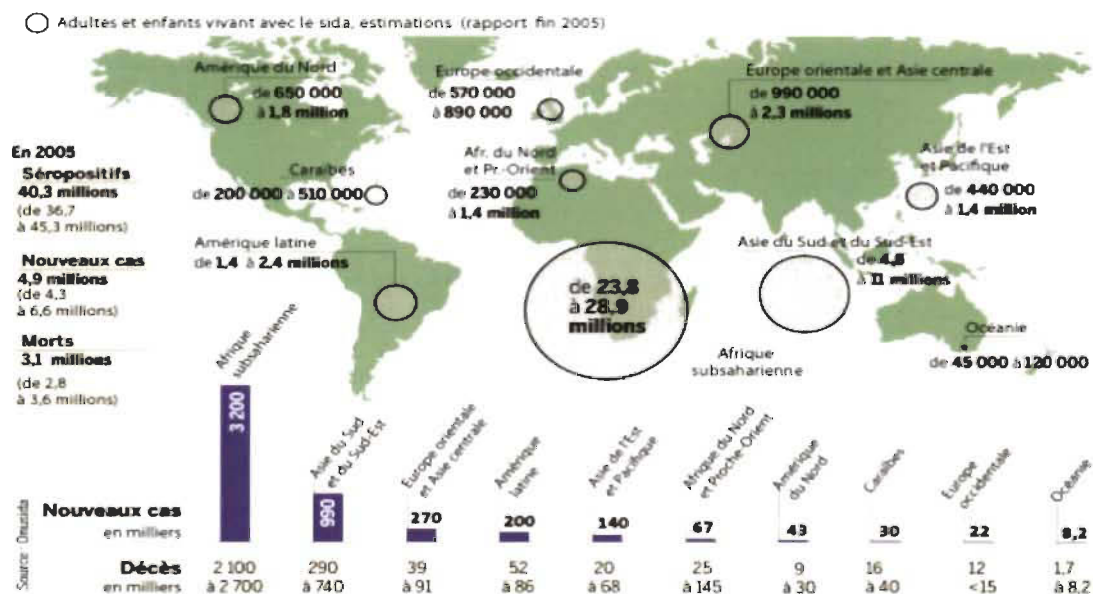


Figure 1.1: Répartition mondiale du SIDA en 2005. Présentation par région sur la carte mondiale du nombre d'adultes et d'enfants vivant avec le SIDA en 2005. À la gauche de la carte se trouve les estimations du nombre de séropositifs, de nouveaux cas et de décès du au SIDA en 2005. Le nombre de nouveaux cas et de décès sont d'ailleurs présentés par région en dessous de la carte mondiale (Onusida 2005).

1.2 Le virus de l'immunodéficience humaine

L'agent causal du SIDA est le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Le VIH appartient à la famille des rétrovirus caractérisée par la propriété de transcrire son matériel génétique sous forme d'acide ribonucléique (ARN) en acide désoxyribonucléique (ADN). Le VIH fait également partie de la sous-famille des lentivirus. Les virus de cette sous-famille ont plusieurs points communs dont a) une longue période d'incubation, b) l'apparition de maladies à évolution lente et c) une baisse des défenses immunitaires de l'hôte (DeFranco et al. 2009).

Deux types de VIH peuvent infecter l'humain, le VIH-1 et le VIH-2. L'émergence de ces virus provient de plusieurs transmissions inter-espèce (zoonose) du virus de l'immunodéficience simienne (SIV) à l'homme. Le VIH-1 est responsable de la pandémie actuelle. Identifié en 1983, son réservoir primaire est le chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes* (Gao et al. 1999). Le VIH-2 a, quant à lui, été identifié en 1985 et est principalement présent en Afrique de l'ouest. Son réservoir primaire est le singe mangabey enfumé « sooty mangabey » (*Cercocebus atys*) (Reeves et Doms. 2002).

1.2.1 Carte génomique du VIH

Les génomes du VIH-1 et du VIH-2 partagent 42% d'homologie. Ces génomes sont constitués de deux molécules d'ARN identiques appariées par des liaisons non-covalentes. Chaque molécule, longue de dix kilobases, est constituée de trois gènes fondamentaux pour les rétrovirus a) gag, b) pol et c) env ainsi que les gènes codant pour les protéines régulatrices. De plus, à chaque extrémité du génome est présente une séquence de longueur variable appelée long terminal repeat (LTR). Ces séquences permettent l'intégration du génome viral dans le génome de l'hôte. Elles contiennent également les

éléments promoteurs nécessaires à l'expression des gènes. (Figure 1.2) (Janeway et al. 2003).

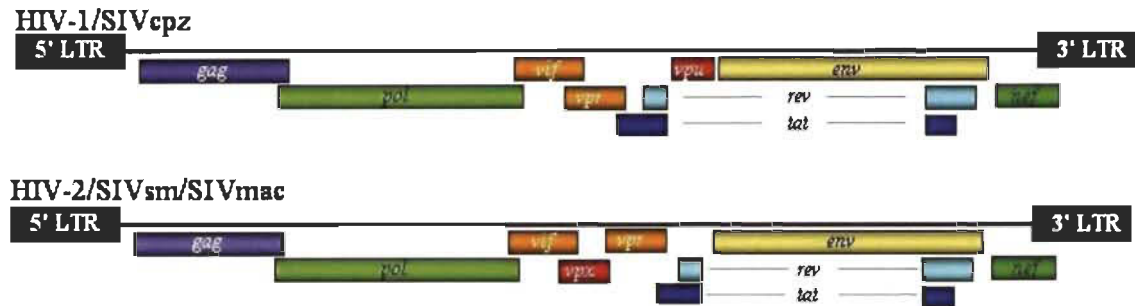


FIGURE 1.2: Carte génomique VIH-1/VIH-2. Comparaison de la carte génomique du VIH-1 et du VIH-2 présentant les gènes principaux et les gènes accessoires (Dicos 2009).

Le gène gag, qui signifie gène de l'antigène du groupe, code pour les protéines a) de la matrice (MA), b) de la capside (CA) et c) de la nucléocapside (NC). Le gène pol, pour polymérase, code pour trois enzymes indispensables à la réplication du virus : a) transcriptase inverse, b) intégrase et c) protéase. Le gène env, pour enveloppe, permet la synthèse des glycoprotéines d'enveloppe. En plus de ces trois gènes, des gènes codant pour les protéines régulatrices sont présents dans le génome du VIH: a) tat, b) rev, c) vif, d) vpr, e) vpu(VIH-1) ou vpx (VIH-2) et f) nef (Tableau 1.1) (Janeway et al. 2003).

TABLEAU 1.1
Protéines virales du VIH, tailles et fonctions (Levy 2007)

Protéines	Appellation^a et taille (kDa)	Fonctions
Gag	p24	Capside (Ca), protéine de structure
	p17	Matrice (Ma), Myristoylée
	p7	Nucléocapside, aide lors de la transcription inverse
	p6	Impliquée dans le bourgeonnement
Polymérase (pol)	p66, p51	Transcriptase inverse : RNase H
Protéase (PR)	p10	Clivage post-traductionnel des protéines virales
Intégrase (IN)	p32	Intégration de l'ADN _c viral
Enveloppe (Env)	gp120	Protéine périphérique d'enveloppe
	gp41	Protéine transmembranaire d'enveloppe ^d
Tat ^b	p14	Permet la surexpression de tous les gènes viraux
Rev ^b	p19	Régulation de l'expression de l'ARN _m
Nef	p27	Pléiotropique, peut augmenter la réplication virale
Vif	p23	Neutralise les mécanismes innés de défenses antirétrovirales liés à APOBEC3G
Vpr	p15	Aide dans la réplication virale
Vpu ^{b-c}	p16	Aide dans le relargage viral; perturbe les complexes gp160/CD4
Vpx ^d	p15	Aide à l'entrée et à l'infectivité virale

^a : Le nombre dans l'appellation désigne le taille (kDa)

^b : N'est pas retrouvé dans la structure du virion

^c : Seulement présent chez le VIH-1

^d : Seulement codé par le VIH-2, peut être une duplication de Vpr

1.2.2 Structure du virus

Le VIH est formé a) d'une enveloppe, b) d'une capsidie et c) d'un génome (Moussard 2005). L'enveloppe est constituée d'une bicouche lipidique (provenant de la membrane cellulaire), et des glycoprotéines gp120 et gp41 obtenues suite au clivage d'un précurseur commun la gp160. La gp41 est transmembranaire alors que la gp120 est périphérique. À l'intérieur de l'enveloppe est retrouvée une matrice virale composée de protéines p17 et à l'intérieur encore est retrouvée la capsidie virale formée d'un assemblage d'environ 2000 protéines p24. Au cœur de la capsidie se trouve le génome viral

ainsi que les enzymes a) protéase, b) intégrase et c) transcriptase inverse (Figure 1.3) (Sanao 2007b).

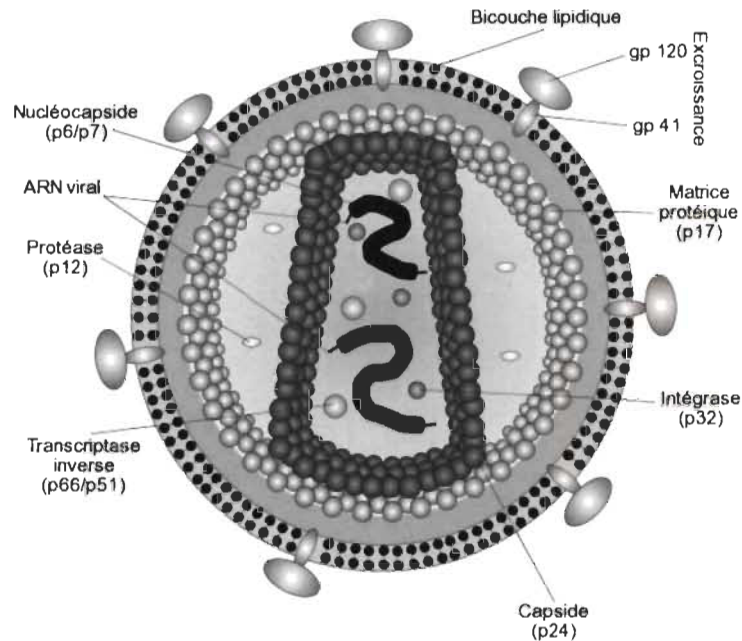


FIGURE 1.3: Schéma présentant la structure du VIH. Il montre les principales protéines et enzymes du virus (Sanao 2007b).

Comme mentionné plus haut, les capsides rétrovirales sont composées d'environ 2000 protéines de capside (Figure 1.4). Les protéines de capside rétrovirales sont composées de deux domaines indépendants, le domaine N-terminal (NTD) et le domaine C-terminal (CTD) reliés par une séquence de liaison (Linker). Les deux domaines (CTD et NTD) ont principalement une structure secondaire en hélice- α : le domaine NTD a la forme d'une pointe de flèche avec sept hélices- α et une boucle en épingle à cheveux, alors que le domaine CTD est plus globuleux avec un tour d'hélice 3_{10} (hélice contenant 3 résidus par tour et 10 atomes par boucle) et quatre petites hélices- α . Le modèle général de l'arrangement des protéines de capside est un treillis hexamérique, avec le domaine NTD formant l'hexamère et le domaine CTD formant des liaisons dimériques connectant les hexamères entre-eux. Ce treillis est fermé à chaque extrémité par des pentamères. Le VIH possède une capside conique.

Celles-ci ont la particularité de présenter une distribution asymétrique de ces pentamères à chaque extrémité (Ganser-Pornillos et al. 2007).

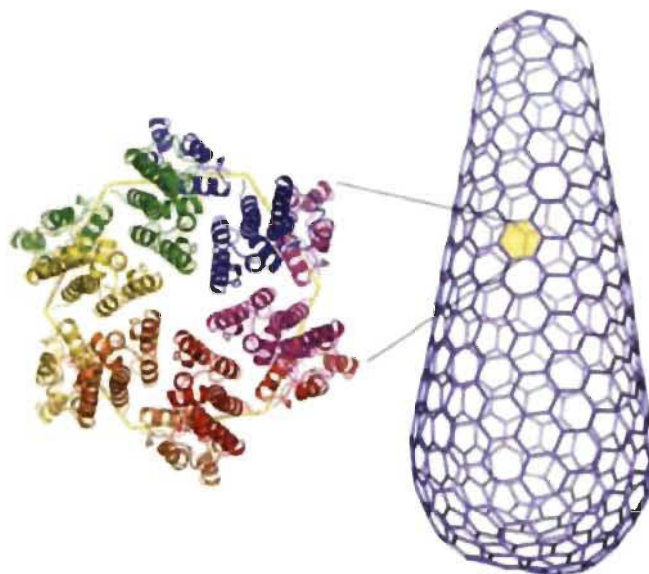


FIGURE 1.4 : Structure conique du VIH. Le VIH présente une capsid conique formée d'environ 2000 protéines de capsid. Ces protéines s'associent pour former des hexamères (gauche). À droite est présenté le modèle tridimensionnel de la capsid virale du VIH, formé par l'association des pentamères et des hexamères (Ganser-Pornillos et al. 2007)

1.2.3 Cycle de réplication du VIH

Le cycle de réplication rétroviral contient plusieurs étapes (Figure 1.5). Premièrement, l'**attachement** est la fixation spécifique du virus sur la cellule cible. Celle-ci repose sur l'interaction entre la gp120 et le récepteur de la cellule cible CD4. Un changement de conformation est alors observé chez la gp120. Par la suite, la gp120 est attirée vers un co-récepteur, devant être présent à côté du récepteur CD4. Les principaux co-récepteurs sont CXCR4 pour les lymphocytes et CCR5 pour les macrophages. L'union de la gp120 et de son co-récepteur libère la protéine gp41 (Sanao 2007a). La **pénétration** est la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cytoplasmique de la cellule cible via un peptide présent dans la gp41. Cette fusion permet au virus d'entrer dans la cellule sous la forme de complexe de réplication. Le complexe de réplication

consiste donc en a) la capside virale, b) le génome (2 brins d'ARN) et c) les enzymes virales (transcriptase inverse et intégrase) ainsi qu'un certain nombre de protéines cellulaires (Huraux 2003).

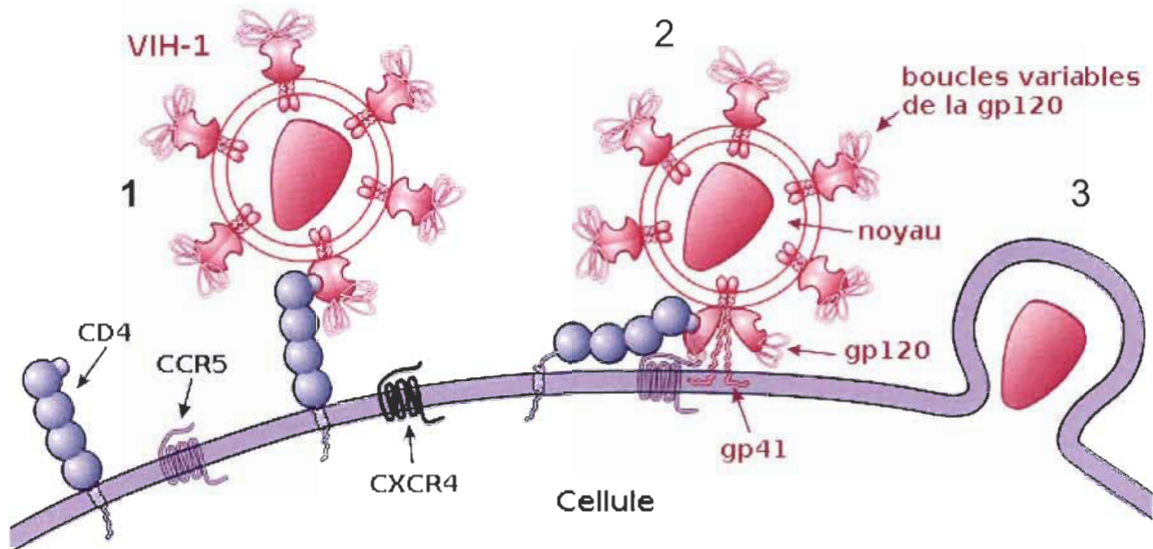


FIGURE 1.5 : Processus d'attachement du VIH. (1) Fixation de la gp120 au récepteur CD4, (2) fixation d'une boucle variable de la gp120 au co-récepteur et fixation de la gp41 sur la membrane cellulaire et (3) pénétration dans la cellule (Sanao 2007a).

La troisième étape est la **décapsidation**, c'est-à-dire l'étape où la capside va se désolidariser du reste du complexe de réplication, libérant ainsi le génome et les enzymes virales dans le cytoplasme de la cellule cible. L'ARN viral simple brin positif permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADN_c) simple brin négatif grâce à la transcriptase inverse puis l'activité RNase H de celle-ci dégrade le brin d'ARN. Par la suite, le deuxième brin d'ADN est synthétisé par la transcriptase inverse. L'ADN viral étroitement associé à l'intégrase et à des composantes protéiques virales et cellulaires va entrer dans le noyau sous forme de complexe de pré-intégration. Lors de l'**intégration**, l'ADN va s'insérer au hasard dans le génome de l'hôte dans une réaction catalysée par l'intégrase formant ainsi le provirus. Les étapes dites précoces de l'infection sont a) l'adsorption, b) la pénétration, c) la décapsidation ainsi que d) l'intégration (Huraux 2003).

L'étape suivante est l'**expression** des gènes viraux : l'ADN viral est transcrit en ARN_m par une ARN polymérase et sera épissé ou non. L'ARN_m est traduit en protéines virales (a) protéines de structure, b) enzymes virales, c) enveloppe et d) protéines de régulation). Puis, l'assemblage des protéines virales et de l'ARN_m viral non épissé va former une nouvelle particule infectieuse (le virion). Lors de la **libération**, le virion va être relargué par bourgeonnement. La **maturation** des protéines entraîne la ré-organisation des différentes protéines de structure, le nouveau virus va alors pouvoir infecter d'autres cellules. Ces dernières étapes sont les étapes tardives de l'infection (Figure 1.6) (Huraux 2003).

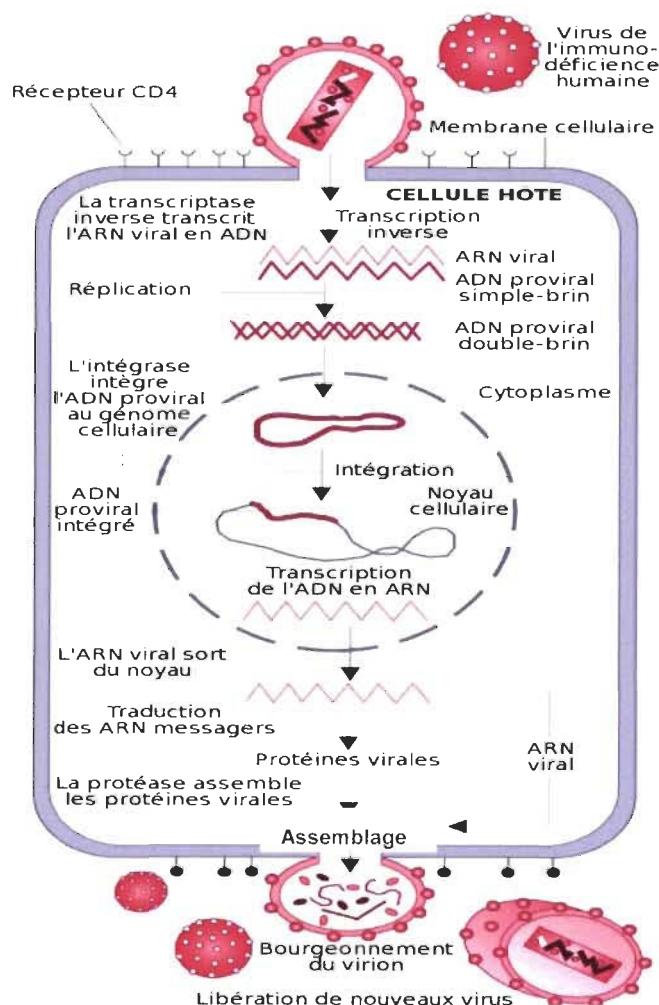


FIGURE 1.6 Cycle de réplication du VIH. Étapes de réplication du VIH de la fixation à la membrane de la cellule cible à la maturation du nouveau virus (Sano 2007).

1.3 Facteurs de restriction

Les mammifères sont capables de produire une réponse défensive contre des pathogènes extérieurs. Cette réponse est immunitaire et peut être innée, acquise ou intrinsèque. L'immunité innée est non spécifique et constitue la première ligne de défense contre les infections. Quatre types de barrières défensives forment l'immunité innée: a) anatomique (peau et muqueuses), b) physiologique (température, pH acide, lysozyme, interféron et complément), c) phagocytaire (monocytes, neutrophiles et macrophages) et d) inflammatoire (cytokines, histamine et fibrine). L'immunité acquise est, quant à elle, spécifique, c'est-à-dire qu'elle peut reconnaître et éliminer sélectivement des micro-organismes étrangers. L'immunité acquise implique deux groupes de cellules essentielles : les lymphocytes (T CD4⁺ et CD8⁺ et B) et les cellules présentatrices de l'antigène (a) macrophages, b) lymphocytes B et c) cellules dendritiques) (Brunner 2006). Toutefois, pour les infections rétrovirales, il existe une immunité dite intrinsèque. Elle diffère de l'immunité innée et de l'immunité acquise dans la mesure où les cellules qui la constituent sont autonomes (c'est-à-dire qu'elle ne s'appuie pas sur des facteurs sécrétés), elle est présente dans plusieurs types cellulaires (plutôt que seulement dans des cellules immunitaires spécialisées) et elle n'a pas besoin d'être induite par des infections rétrovirales (Emerman 2006). La plupart des auteurs considèrent que l'immunité intrinsèque fait partie de l'immunité innée puisque les médiateurs de cette immunité sont exprimés dans de nombreuses cellules, ne sont pas très spécifiques et sont régulés par les interférons. Les médiateurs de l'immunité intrinsèque sont des protéines nommées facteurs de restriction. Les facteurs de restriction les plus étudiés sont a) APOBEC3G, b) Tetherin, c) FV1 (facteur murin) et d) TRIM5 α .

1.3.1 APOBEC

Les protéines APOBEC (apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide) sont un groupe de cytidine désaminases qui, chez les humains, comprend a) activation-induced cytidine deaminase "AID", b) APOBEC1 tous deux sur le chromosome 12, c) APOBEC2 présent sur le chromosome 6. De plus une série de sept gènes APOBEC3 sont présents en tandem sur le chromosome 22 soit (d) APOBEC3A, e) APOBEC3B, f) APOBEC3C, g) APOBEC3DE, h) APOBEC3F, i) APOBEC3G et j) APOBEC3H) et finalement k) APOBEC4 sur le chromosome 1 (Goila-Gaur 2008).

1.3.1.1 Structure

Tous les membres de la famille APOBEC possèdent une structure caractéristique : a) une petite hélice- α suivie de b) un domain catalytique (CD) en doigts de zinc, c) un petit peptide de liaison et d) un domaine pseudocatalytique (PCD). Dans les protéines APOBEC3B, APOBECF et APOBEC3G la structure entière est dupliquée (hélice- α 1-CD1-peptide de liaison1-PCD1-hélice- α 2-CD2-peptide de liaison2-PCD2) (Goila-Gaur 2008).

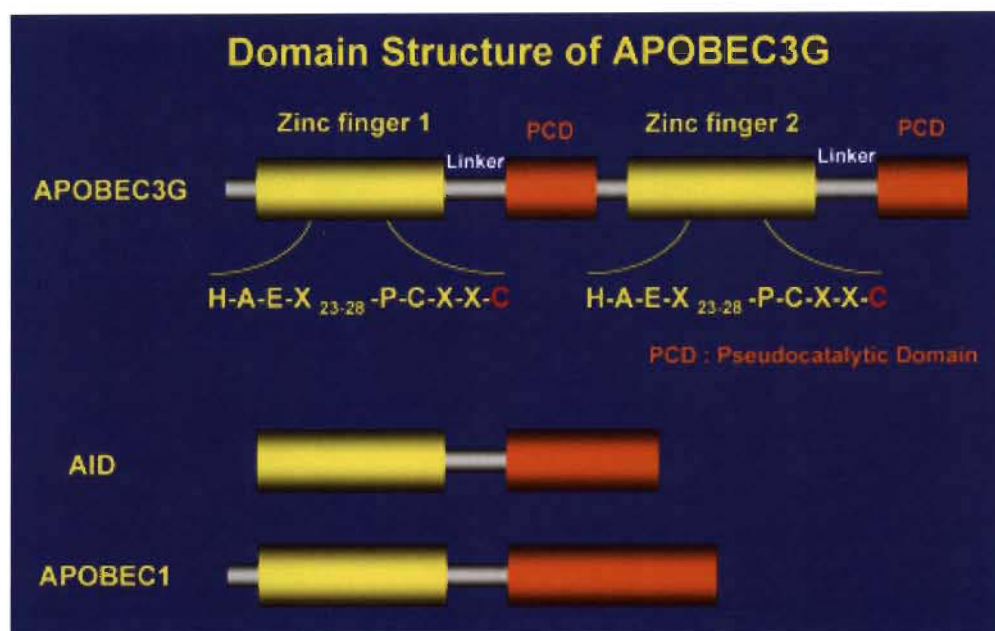


Figure 1.7 : Structure de la famille APOBEC. Pour fins de comparaison, les structures des protéines AID et APOBEC1 sont aussi incluses. APOBEC3G possède deux domaines en doigts de zinc tous deux suivis d'une région de liaison « Linker » et d'un domaine PCD (Levin 2009).

1.3.1.2 Mécanisme d'action

La réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4⁺ et les monocytes est dépendante de la présence de la protéine accessoire Vif. Vif est requise pour la production de virus VIH-1 infectieux dans certaines lignées cellulaires immortalisées de cellules T comme par exemple les cellules CEM (non-permissives) contrairement à d'autres lignées cellulaires comme par exemple les cellules CEM-SS (appelées permissives). La comparaison des deux types cellulaires a mené à la découverte du facteur de restriction APOBEC3G (Malim 2008).

Pour exercer son activité antivirale, APOBEC3G doit être exprimé dans la cellule responsable de l'assemblage et du relargage des virions. L'enzyme est alors incorporée dans les virus nouvellement synthétisés. Lors de l'infection, l'enzyme encapsidée induit la désamination des résidus cytosine (C). Suite à la

réverse transcription, les résidus C sont convertis en résidus uracile (U) sur le premier brin d'ADN (négatif). Les ADN ainsi mutés vont alors suivre deux voies. Quelques-uns des ADN vont probablement être reconnus par une uracil N glycosidase (présente dans la cellule hôte). Celle-ci va supprimer les résidus U dans l'ADN résultant en un site abasique. Ces sites vont être reconnus par des enzymes de réparation de l'ADN et entraîner la dégradation de l'ADN. Si la transcription inverse est complétée, le double brin d'ADN va être intégré dans le génome de la cellule hôte. Les conversions C→U sur le brin négatif entraînent des hypermutations guanine→adénosine sur le brin positif. Le provirus hypermuté sera incapable de produire des protéines fonctionnelles (Figure 1.8) (Goff 2004).

Vif inactive APOBEC3G en médiant sa dégradation dans la cellule productrice (cellules responsable de l'assemblage du virion), en empêchant son incorporation dans le virus. Vif agit en marquant APOBEC3G qui devient alors la cible d'une ubiquitine ligase (Figure 1.8) (Goff 2004).

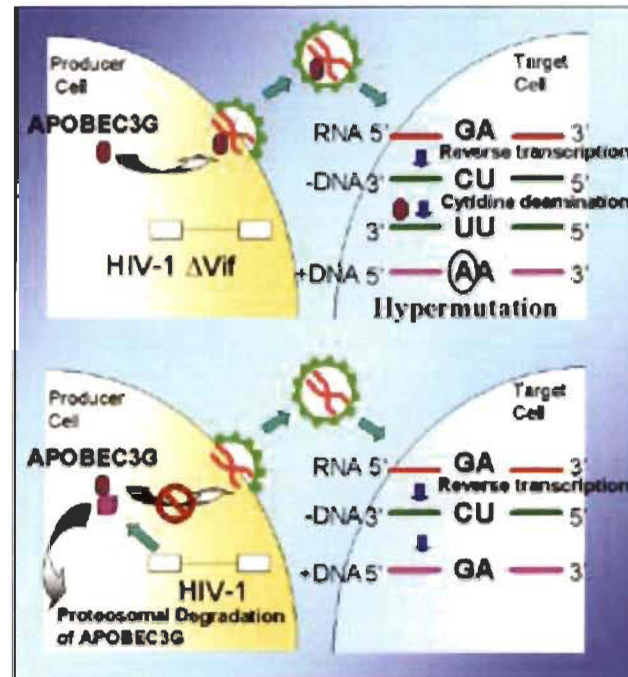


FIGURE 1.8 : Action antivirale d'APOBEC3G. La section du haut montre le mécanisme d'action d'APOBEC3G dans les cellules permissives alors que la section du bas le présente dans les cellules non-permissives (National Cancer Institute 2009).

1.3.2 Tetherin

La tetherin (aussi appelée BST-2 et HM1.24) a récemment été découverte lors d'expériences sur la protéine accessoire du VIH-1, Vpu. Ces études ont démontré que Vpu est requise pour le relargage efficace des virions chez certaines lignées cellulaires contrairement à d'autres. Une expérience de fusion cellulaire a suggéré l'existence d'un inhibiteur de la libération virale (Varthakavi et al., 2003). Les premières analyses, utilisant le virus VIH-1 dont la protéine Vpu est déletée ont montré une accumulation des virions à la membrane plasmique ainsi qu'à l'intérieur de vacuoles intracellulaires (endosomes CD63+). Des analyses plus poussées, utilisant la puce à ADN, ont permis d'identifier la protéine CD317, maintenant connue sous le nom de Tetherin. Cette protéine n'avait jusqu'à présent aucune fonction connue (Bieniasz 2008).

1.3.2.1 Structure

La tetherin est une protéine membranaire avec une topologie unique. Elle est formée à son extrémité N-terminale, d'une queue cytoplasmique responsable de la distribution subcellulaire et d'un domaine d'ancrage transmembranaire. Son extrémité C-terminale est constituée d'un lipide d'ancrage glycosyl phosphatidyl inositol nécessaire à l'inhibition du relargage des virions. Ces deux domaines membranaires sont liés par un domaine extracellulaire présentant un motif coiled-coil (Figure 1.9) (McNatt 2009).

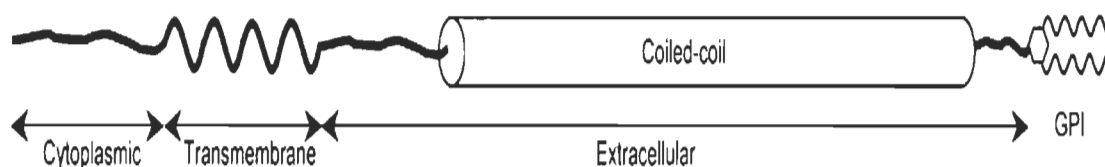
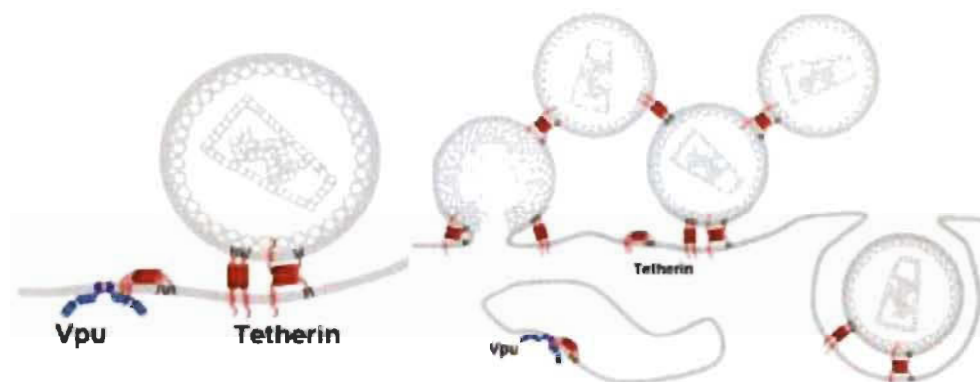


FIGURE 1.9 : Structure de la Tetherin. Schéma présentant les différents domaines de la Tetherin ainsi que leur localisation dans la cellule (McNatt 2009).

1.3.2.2 Mécanisme d'action

L'activité antivirale de la Tetherin peut être induite par l'interféron- α (INF- α) et consiste en la rétention de virions matures à la membrane plasmique de la cellule infectée. Ensuite, une proportion des virions va être internalisée et s'accumuler dans les endosomes CD63+. La protéine accessoire transmembranaire Vpu du VIH agit comme un antagoniste viral de la Tetherin (Figure 1.10). Il a d'ailleurs été montré que la Tetherin et Vpu co-localisent (Neil 2008) et que la dégradation de la Tetherin par le protéasome est médiée par Vpu (Goffinet et al., 2009).



Nature Feb 2008 451 425-30

FIGURE 1.10 : Mécanisme d'action de la Tetherin. Inhibition du relargage des virions par la Tetherin et présentation de l'action de Vpu sur la Tetherine (Neil 2008).

1.3.3 Fv1

Le facteur de restriction le plus ancien (identifié en 1970) est Fv1. Fv1 est un facteur de restriction murin qui agit contre le virus MLV (virus de la leucémie murine). Les souches de virus MLV ont été divisées en N-tropique (MLV-N), B-tropique (MLV-B) ou NB-tropique (MLV-NB). L'allèle $Fv1^n$, retrouvé chez la souris suisse NIH, permet la réplication du virus MLV-N et bloque la réplication du virus MLV-B. L'allèle $Fv1^b$, présent chez la souris Balb/c, permet quant à lui la réplication du virus MLV-B et bloque la réplication du virus MLV-N. Un troisième allèle, $Fv1^{nr}$, un variant de $Fv1^n$, est présent dans certaines souches. Quelques souches n'ont pas d'activité de restriction et portent une version nulle de Fv1, $Fv1^0$. La résistance rétrovirale est co-dominante lors de croisements génétiques, donc les souris $Fv1^{n/b}$ hétérozygotes sont résistantes aux virus N-tropique et B-tropique. Le déterminant du tropisme viral (B ou N) se situe au niveau du domaine CA de la protéine Gag. Le tropisme est déterminé en grande partie par un résidu amino acide de la CA (#110). Le virus MLV-N possède en position 110 une arginine alors que le virus MLV-B possède un glutamate (Goff 2004).

1.3.3.1 Mécanisme d'action de Fv1

Le mécanisme d'action de Fv1 est encore méconnu. Le virus subit un blocage dans la phase précoce de l'infection c'est-à-dire après la transcription inverse du génome viral (ARN en ADN linéaire) mais avant son entrée dans le noyau et l'intégration de l'ADN viral dans le génome de l'hôte (Takeuchi 2008).

1.3.4 La famille TRIM

La famille TRIM code pour des protéines contenant un motif Tri-partite (« Tri-partite motif », aussi appelé RBCC pour RING, B-Box et coiled-coil). Ce motif consiste en a) un domaine « RING » en position N-terminale, b) un ou deux domaines « B-Box » et c) un domaine en hélice- α « coiled-coil » en position C-terminale. L'ordre et l'espacement de ces domaines sont conservés (Nisole 2005). L'espace entre le domaine RING et le domaine B-Box se nomme « Linker 1 » et celui retrouvé entre le domaine B-Box et le domaine coiled-coil se nomme « Linker 2 ». Le motif RBCC est habituellement suivi, en position C-terminale, par un ou deux domaines spécifiques pour chaque TRIM. Jusqu'à maintenant, 68 gènes et un pseudogène ont été identifiés dans le génome humain (Reymond 2001). La figure 1.11 montre une représentation schématique des protéines TRIM identifiées jusqu'à présent. Des homologues de certains TRIMs sont retrouvés chez les primates, les bovins (Si et al., 2006), les chats, les chiens, les lapins, l'anguille (Miyamoto 2002), le nématode (*C. elegans* Sequencing Consortium 1998), etc.

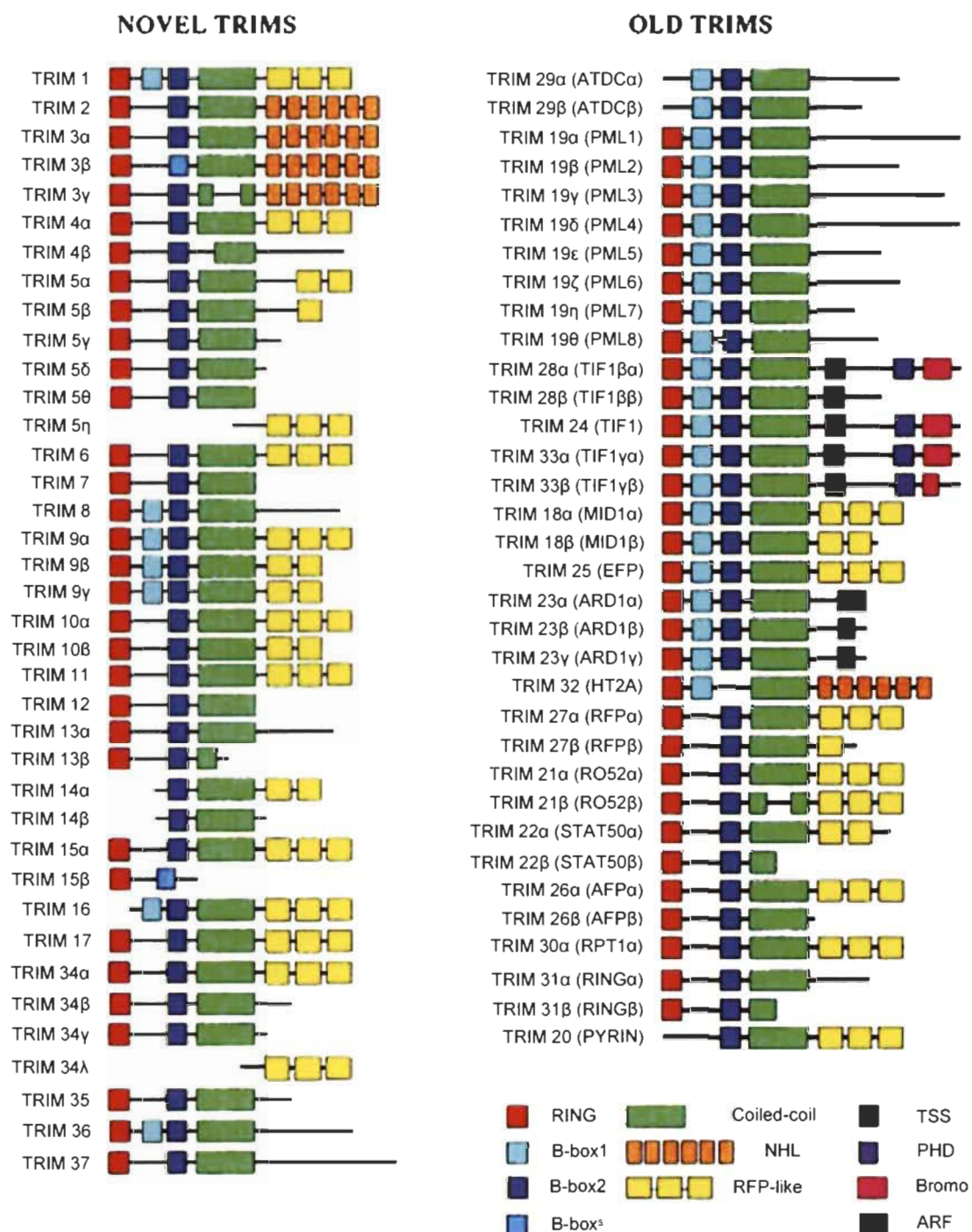
A

FIGURE 1.11: Schéma des protéines TRIM identifiées. Les domaines RING, B-Box et coiled-coil sont présentés en rouge, bleu et vert respectivement. Les domaines en position C-terminale sont aussi indiqués (Nisole 2005).

1.3.4.1 Fonction des différents domaines de TRIM

Le domaine N-terminal de pratiquement tous les TRIM est le domaine RING, domaine en doigt de zinc de 40 à 60 résidus pouvant lier deux atomes de zinc (Saurin et al., 1996). Plusieurs domaines RING ont une activité E3 ubiquitine-ligase (Freemont P.S., 2000) (Joazeiro C.A. et Weissman A.M., 2000). Dans la famille TRIM, cette activité est présente chez TRIM5 δ (Xu L. et al., 2003), TRIM18 (Trockenbacher A. et al., 2001), TRIM25 (Urano T. et al., 2002) TRIM32 (Horn E. J. et al., 2004) et TRIM35 (Vichi A. et al., 2005).

Adjacent au domaine RING se trouvent les domaines B-Box, B1 et B2, deux motifs en doigt de zinc CHC3H2 d'environ 40 résidus chacun (Reddy 1992). Les deux domaines B-Box diffèrent l'un de l'autre dans le nombre et l'espacement des résidus Cystéine et Histidine conservés. Lorsque présents ensemble, B1 précède toujours B2 et seulement B2 peut être retrouvé seul. Les domaines B-Box sont trouvés exclusivement dans les protéines TRIM et sont probablement un déterminant important de la famille (Reymond 2001). Cependant, aucune fonction ne leur a clairement été assignée.

Le troisième domaine est le domaine coiled-coil, une hyper-structure secondaire formée par l'entrelacement de multiples hélice- α . Le domaine coiled-coil peut s'assembler avec d'autres domaines coiled-coil et en conséquence former des interactions homo-oligomériques et hétéro-oligomériques (Nisole 2005). Dans le cas des protéines TRIM la région coiled-coil promouvoit l'oligomérisation de la protéine, puisque sa délétion empêche l'auto-association de la protéine (Reymond et al. 2001). Cependant, il est aussi clair que les autres domaines peuvent influencer ces interactions (Borden et al. 1995, Cao et al. 1997 et Peng et al. 2000).

Le motif RBCC des protéines TRIM est habituellement suivi de un ou deux domaines C-terminaux de grandeur et de compositions différentes. Comme le motif RBCC est commun à tous les TRIM, leur fonction respective est hautement dépendante de la capacité du domaine en C-terminal à recruter des partenaires spécifiques (Nisole 2005).

1.3.4.2 Rôles biologiques des différents TRIM

Dans la vaste famille des protéines TRIM, quelques-unes ont été caractérisées. Elles sont impliquées dans plusieurs processus biologiques incluant a) la prolifération cellulaire, b) la différenciation, c) le développement, d) l'oncogénèse, e) l'apoptose (Reymond 2001) et f) la restriction rétrovirale (Stremlau et al. 2004, Yap et al. 2004 et Tissot et al. 1995).

Des mutations dans les gènes codant certains TRIM ont été associées à des maladies humaines. Par exemple, les protéines TRIM20, TRIM18, TRIM32 et TRIM37 sont impliquées respectivement dans la fièvre méditerranéenne familiale, « X-linked Opitz G/BBB syndrome » (syndrome congénital multiple caractérisé par des anomalies faciales), « limb-girdle muscular dystrophy » (affecte les muscles volontaires dans la région pelvienne et les épaules) et « Mulibrey nanism » (nanisme des muscles, du foie, du cerveau et des yeux) (Quaderi 1997, The French FMF consortium 1997, The international FMF consortium 1997 et Avela 2000). TRIM19, TRIM27 et TRIM24 acquièrent une activité oncogénique lorsque fusionnées avec les récepteurs de l'acide rétinoïque alpha, RET et Braf respectivement (Takahashi 1988, Grignani 1994 et Le Douarin 1995).

Plusieurs membres de la famille TRIM possèdent une activité antivirale comme par exemple TRIM1, TRIM5 α , TRIM19, TRIM22 et TRIM32. TRIM5 α présente l'activité antivirale la plus forte (Uchil et al. 2008). TRIM1 peut inhiber le virus MLV-N alors que TRIM19 inhibe faiblement différents virus : a) le virus

de l'herpès simplex de type 1, b) le virus Ébola, c) le virus de la chorioméningite lymphocytaire, d) le virus de Lassa, e) le virus de l'influenza, f) le virus de la stomatite vésiculaire, g) le cytomégalovirus et h) le VIH. TRIM22 inhibe le VIH-1 et TRIM32 empêche la réplication a) du VIH-1, b) du VIH-2 ainsi que c) Du virus de l'anémie infectieuse équine (EIAV) (Nisole et al. 2005).

1.3.5 TRIM5 α

1.3.5.1 Découverte de TRIM5 α

Les études qui ont mené à la découverte de TRIM5 α ont été réalisées par Wolfgang Hofmann et Matthew Stremlau (deux membres de l'équipe de Joseph Sodroski). Tout d'abord, Hofmann a montré que plusieurs espèces de mammifères expriment une résistance au VIH-1 et à d'autres virus. Plus particulièrement, le VIH-1 était soumis à restriction chez les singes Rhésus mais pas chez l'humain. De plus, dans une même espèce, les différents types cellulaires présentaient des niveaux comparables de restriction. Il a donc émis l'hypothèse qu'un facteur cellulaire pourrait être impliqué dans la restriction des différents rétrovirus (Hofmann et al., 1999). Matthew Stremlau a, par la suite, cherché un facteur cellulaire responsable de cette restriction. Pour ce faire, il a transduit une banque d'ADN_c, préparée à partir de fibroblastes primaires de poumons de singe Rhésus, dans des cellules humaines *HeLa* (cellules cancéreuses issues d'un cancer du col utérin). Les cellules transduites ont été infectées par le virus VIH-1/GFP (protéine fluorescente verte) et deux clones résistants à l'infection donc n'exprimant pas GFP ont été identifiés. C'est alors que TRIM5 α a été isolé de ces cellules et caractérisé comme étant un inhibiteur de la réplication du VIH-1 (Stremlau et al., 2004).

1.3.5.2 Structure détaillée et fonction des domaines de TRIM5 α

Comme mentionné précédemment, TRIM5 α comme tous les TRIMs possède un motif RBCC. Cependant, il présente en plus un domaine SPRY complet (aussi connu sous le nom de domaine B30.2) (Reymond et al., 2001) (Figure 1.12). Le domaine SPRY possède quatre régions variables nommées a) v1, b) v2, c) v3 et d) v4. Ces domaines variables forment des boucles à la surface de la protéine et interagissent avec la capsid virale. C'est donc la séquence de ces régions variables qui détermine la spécificité de la restriction (les rétrovirus inhibés) (Maillard et al., 2007). Le domaine coiled-coil est essentiel pour l'oligomérisation de la protéine TRIM5 α (Perez-Caballero et al., 2005). Le domaine RING possède une activité E3 ubiquitine-ligase impliquée dans la dégradation par le protéasome. De plus, des mutations ou la délétion du domaine RING diminue en partie seulement l'activité antivirale ce qui implique que ce domaine participe à l'activité de restriction par TRIM5 α sans être essentiel à celle-ci (Javanbakht et al., 2005). Le domaine B-box est unique aux membres de la famille TRIM. Il joue un rôle méconnu mais néanmoins important dans la fonction des protéines TRIMs. Le domaine B-box2 de plusieurs TRIMs est impliqué dans les interactions protéine-protéine, la multimérisation et la localisation subcellulaire. Des changements ou des délétions introduites dans ce domaine éliminent l'activité antivirale de TRIM5 α (Li et al., 2008).

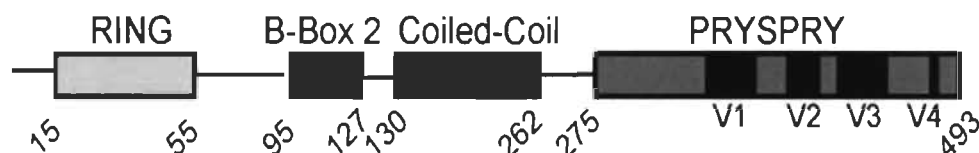


FIGURE 1.12 : Schéma du motif RBCC de TRIM5 α hu. Les nombres représentent les positions des acides aminés aux frontières de chaque domaine. V1 à V4 représentent les 4 régions variables du domaine SPRY (Maillard et al., 2007).

1.3.5.3 Les isoformes de TRIM5

Le gène de TRIM5 est présent sur le chromosome 11p15 et contient 8 exons et 7 introns. La transcription du gène de TRIM5 permet la synthèse de plusieurs isoformes : a) TRIM5 α , b) TRIM5 δ , c) TRIM5 γ , d) TRIM5 θ et e) TRIM5 η . Ceux-ci sont générés par épissage alternatif de l'ARNm. L'isoforme α est la forme la plus longue et possède un domaine SPRY complet (Reymond et al., 2001). Les isoformes TRIM5 δ et TRIM5 γ ont une version tronquée du domaine SPRY. De plus, l'isoforme TRIM5 γ n'inhibe pas le VIH-1 ni le SIV (Stremlau et al., 2004). Deux nouveaux isoformes de TRIM5 (TRIM θ et TRIM η) ont été trouvés chez le *Macaca nemestrina*. TRIM θ possède un domaine SPRY tronqué, causé par une délétion de deux acides aminés entre l'exon 6 et 7. La délétion des deux acides aminés conduit à un décalage du cadre de lecture. La protéine TRIM5 θ code donc pour tous les domaines TRIM (RBCC), la région « linker » et une queue d'environ 10 acides aminés. Quant à lui, TRIM5 η possède en plus de la délétion des deux acides aminés présente dans l'isoforme TRIM5 θ , une délétion des 27 acides aminés de l'exon 7 (Δ exon7). Cette délétion restaure le cadre de lecture qui est interrompu par la délétion des deux acides aminés. TRIM η code alors pour une protéine qui exprime tous les domaines TRIM et la majorité du domaine SPRY (Brennan et al., 2007).

1.3.5.4 Orthologues simiens de TRIM5 α et virus inhibés par ceux-ci

Les singes sont divisés en trois grandes catégories : a) les hominoïdés, b) les singes du vieux monde et c) les singes du nouveau monde. Les hominoïdés correspondent aux Grands Singes : a) les humains, b) les chimpanzés, c) les gorilles et d) les orangs-outans. Sont compris dans les singes du vieux monde a) le singe vert africain (à queue de cochon et Tantalus), b) le singe rhésus et c) le mangabey. Dans les singes du nouveau monde font partie a) le ouistiti, b) le tamarin, c) le capucin, d) le singe écureuil et e) le singe araignée.

La spécificité de restriction correspond en la capacité de l'allèle de TRIM5 α à reconnaître et à interagir avec un virus. Par exemple, TRIM5 α hu inhibe le virus MLV-N alors que TRIM5 α rh inhibe a) le VIH-1, b) MLV-N et c) SIVmac. Le tableau 1.1 dresse une liste des orthologues simiens de TRIM5 α ainsi que les virus inhibés par ceux-ci.

TABLEAU 1.2
Virus inhibés par les différents orthologues de TRIM5 α
(Yap et al. 2004; Song et al. 2005c; Ohkura et al. 2006)

Différents orthologues de TRIM5 α	Force avec laquelle les différents rétrovirus sont inhibés					
	VIH-1 ^a	MLV-N ^b	MLV-B ^c	MoMLV ^d	SIV _{agm} ^e	SIV _{mac} ^f
Humain	-	+++	-	-		-
Chimpanzé	-	+++	-	-		-
Orang-outang	++	+++	-	-		++
Gorille	+	+++				++
Rhésus	+++	++	-	-	+++	-
Agm _{pyq}	++	+++	-	-	-	-
Agm _{tan}	++	+++	-	-	-	+++
Sooty mangabey	++	+++				-
Capucin brun	-	+++				-
Écureuil	-	++	-	-	++	+++
Tamarin cotton-top	++	++	-	-	++	+++
Tamarin empereur	++	++	-	-	++	+++
Goeldi marmoset	-					
Silvery marmoset	-					
Araignée	+++	++	-	-	+++	

^aVirus de l'immunodéficience humaine de type 1

^bVirus de la leucémie murine de tropisme N

^cVirus de la leucémie murine de tropisme B

^dVirus de la leucémie murine de souche Moloney

^eVirus de l'immunodéficience simienne du singe vert africain

^fVirus de l'immunodéficience simienne de macaque

- Aucune inhibition

+ Inhibition faible

++ Inhibition modérée

+++ Inhibition forte

La spécificité de restriction des différents orthologues de TRIM5 α résulte de différences intrinsèques dans la protéine elle-même. Des variations considérables sont retrouvées parmi les protéines TRIM5 α des primates. Les

cystéines et les histidines des domaines RING et B-Box2 sont conservées parmi les orthologues primates. Les séquences des domaines RING, B-Box2 et coiled-coil sont semblables avec quelques variations d'acide aminé individuel selon la catégorie (a) hominidés, b) ancien monde et c) nouveau monde). La majorité des variations sont retrouvées dans le domaine SPRY, domaine essentiel dans l'activité de restriction par TRIM5 α . Il y a d'ailleurs un polymorphisme de longueur considérable dans les régions variables v1 et v3 des protéines TRIM5 α . La région v1 est relativement longue chez les singes du vieux monde alors que chez les singes du nouveau monde, il s'agit de la région v3. Les longues boucles variables du domaine SPRY pourraient produire des structures flexibles et plusieurs motifs de séquence permettant l'interaction avec plusieurs capsides virales (Song et al., 2005b).

1.3.5.5 Localisation de TRIM5 α

TRIM5 α est une protéine cytoplasmique (Reymond et al., 2001). Sa localisation va de pair avec sa fonction antivirale puisque TRIM5 α agit peu après l'entrée du virus dans la cellule soit avant l'accumulation des produits de transcription inverse. Elle est retrouvée soit sous forme diffuse dans le cytoplasme, soit sous forme d'agrégats appelés corps cytoplasmiques. De plus, TRIM5 α est capable de faire la navette entre la forme diffuse et les corps cytoplasmiques. Plus le niveau d'expression de TRIM5 α augmente, plus les corps cytoplasmiques deviennent grands et nombreux. L'analyse par imagerie en temps réel a révélé que les corps cytoplasmiques sont hautement mobiles et présentent deux formes de mouvement : un mouvement court et saltatoire (changements fréquents et aléatoires de direction) et un mouvement long et unidirectionnel. De plus, les mouvements de ces corps cytoplasmiques sont dépendants du réseau de microtubules puisque la perturbation de ce réseau par le nocodazole abolit le mouvement long et diminue considérablement la vitesse moyenne des corps cytoplasmiques (Campbell et al., 2007).

1.3.5.6 La trimérisation de TRIM5 α

Plusieurs protéines TRIM s'auto-associent pour former des homo-oligomères et des hétéro-oligomères (Reymond et al. 2001). Des prédictions structurales suggèrent que le domaine coiled-coil des protéines TRIM a une prédisposition à former des dimères et des trimères (Harbury et al. 1995). L'utilisation d'un agent de réticulation (par exemple le glutaraldéhyde et le bis-éthylène glycol) permet d'analyser la structure quaternaire d'une protéine. Ces agents causent une dénaturation minimale et permettent la conservation de plusieurs systèmes enzymatiques. Le glutaraldéhyde permet la production de liaisons croisées entre protéines proches. En réagissant avec les groupements aminés, carboxyles et indoles d'une protéine, il peut produire des ponts méthyléniques avec d'autres protéines (De Robertis et al., 1983). Des expériences utilisant cette méthode ont été employées dans l'analyse de la multimérisation de TRIM5 α et les résultats ont montré que TRIM5 α est une protéine trimérique et multimérique (Mische et al., 2005). L'analyse de la multimérisation de mutants délétés d'un ou plusieurs domaines a révélé que le domaine coiled-coil est nécessaire à la multimérisation de TRIM5 α . Cependant, il n'est pas suffisant à lui seul pour la formation de trimères, il nécessite des séquences adjacentes, principalement le « Linker 2 » (Javanbakht et al., 2006).

Des études de microscopie cryoélectronique de la capsid du VIH-1 ont révélées deux types de trous à la surface de celle-ci (Figure 1.13): un trou cylindrique au centre de l'anneau hexamérique et un trou trilobé fait à partir des rayons de l'hexamère. Les deux types de trous sont des sites potentiels de liaison des trimères de TRIM5 α (représenté en vert, un trimère de TRIM5 α interagissant avec le trou trilobé; représenté en jaune un trimère de TRIM5 α interagissant avec le trou cylindrique) (Mische et al., 2005).



FIGURE 1.13: Liaisons possibles des trimères TRIM5 α à la CA virale. Identifié en bleu, un trou cylindrique formé par l'anneau hexamérique de protéines de capsid pourrait lier un trimère de TRIM5 α (jaune). Le trou trilobé formé par trois hexamères de capsid adjacents (les trois hexamères sont représentés en rouge) pourrait aussi lier un trimère de TRIM5 α (vert) (Mische et al., 2005).

1.3.5.7 Dégradation et ubiquitination de TRIM5 α

TRIM5 α hu et TRIM5 α rh sont dégradés très rapidement et présentent un temps de demi-vie d'environ une heure dans les cellules HeLa. La présence des domaines RING et B-box 2 intacts contribuent à cette dégradation rapide. Le traitement des cellules exprimant TRIM5 α avec du MG115 (inhibiteur du protéasome) conduit à la diminution du niveau de dégradation de la protéine, indiquant que le protéasome contribue à la dégradation de TRIM5 α (Diaz-Griffero et al., 2005).

La dégradation de protéines par le protéasome est souvent associée à l'ubiquitination. L'ajout d'ubiquitine est réalisé par trois enzymes: a) E1, b) E2 et c) E3. L'ubiquitine est activée par l'enzyme E1 puis transférée à l'enzyme E2, une enzyme de conjugaison. Celle-ci transfère à son tour l'ubiquitine à la protéine

substrat. Auparavant, la protéine substrat a généralement été fixée à l'enzyme ubiquitine ligase E3 (Yeh ETH et al., 2000). Les domaines RING sont habituellement associés à une activité E3 ubiquitine ligase. Récemment, il a été montré que TRIM21 et TRIM5 δ ont une fonction E3 ubiquitine ligase et qu'ils s'auto-ubiquitinent eux-mêmes (Wada k., et al., 2006). Puisque TRIM5 α et TRIM21 sont phylogénétiquement et structuralement similaires, l'hypothèse que TRIM5 α possède aussi une activité E3 ubiquitine ligase a été émise. Il a alors été montré que TRIM5 α peut s'auto-ubiquitiner en présence des enzymes E1 et E2 UbcH5B, TRIM5 α possède donc une activité E3 ubiquitine ligase (Yamauchi et al., 2008). Des formes mono- et poly-ubiquitinées ont été trouvées. La mono-ubiquitination joue un rôle dans le trafic cellulaire et l'interaction entre protéines. Pour TRIM5 α , la mono-ubiquitination pourrait être un signal de translocation des corps cytoplasmiques vers les formes diffuses dans le cytoplasme. L'inhibition du protéasome n'augmente pas les formes ubiquitinées et non-ubiquitinées de TRIM5 α , suggérant que l'auto-ubiquitination de TRIM5 α ne cause pas sa dégradation par le protéasome (Yamauchi et al., 2008). Ces résultats sont contradictoires avec ceux obtenus par Felipe Diaz-Griffero (Diaz-Griffero et al. 2006b)

1.3.5.8 Mécanisme d'action de TRIM5 α

TRIM5 α inhibe la réplication rétrovirale peu de temps après l'entrée du virus dans la cellule. Suite à l'interaction de TRIM5 α avec la capsid virale, la réplication virale peut être empêchée de plusieurs façons: a) une décapsidation précoce, b) une dégradation par le protéasome, c) une inhibition du transport vers le noyau ainsi que d) une séquestration de la capsid virale dans les corps cytoplasmiques de TRIM5 α .

1.3.5.8.1 Accélération de la décapsidation virale par TRIM5 α

L'étude de mutants de la capsid du VIH-1 suggère que le déshabillage de la capsid est une étape régulée dans le temps, où le désassemblage trop rapide ou trop lent compromet l'infectivité du virus (Forshey et al., 2002). Pour étudier le désassemblage de la capsid, Matthew Stremlau (équipe de Joseph Sodroski) a mis au point une expérience de sédimentation sur coussin de sucrose (50%) permettant de (1) distinguer la capsid non spécifique contenue dans les endosomes de la capsid cytosolique et (2) de séparer la capsid particulaire (pas encore désassemblée) de la capsid soluble. Après l'infection, la présence de TRIM5 α dans les cellules cibles résulte en la diminution de la quantité de capsid particulaire dans le cytoplasme. Dans certains cas, cette perte de capsid particulaire était accompagnée d'une augmentation du nombre de protéines de capsides solubles. TRIM5 α entraîne la disparition de la capsid particulaire du VIH-1 dans la première heure d'infection (Stremlau et al., 2006). De plus, TRIM5 α entraîne, quant à lui, la disparition de la capsid particulaire de MLV-N dans les quinze premières minutes d'infection (Perron et al., 2007). Donc, TRIM5 α restreint l'infection rétrovirale en reconnaissant spécifiquement la capsid virale et en entraînant un désassemblage précoce.

1.3.5.8.2 Dégradation par le protéasome

Deux faits semblent impliquer le système ubiquitine-protéasome dans la restriction par TRIM5 α . Tout d'abord, l'isoforme δ de TRIM5, qui contient un domaine RING identique à celui de TRIM5 α , présente une activité E3 ubiquitine-ligase (Xu et al., 2003). Des délétions ou des mutations dans le domaine RING de TRIM5 α résultent en une perte significative de l'efficacité de TRIM5 α (Javanbakht et al., 2006). Ensuite, l'inhibition de l'activité du protéasome modifie l'étape à laquelle la restriction médiée par TRIM5 α se produit (Wu et al., 2006, Anderson et al., 2006). Ces observations portent à croire que le protéasome

pourrait participer à la restriction en dégradant les complexes TRIM5 α /capside. Pour le démontrer, des cellules 293T exprimant TRIM5 α rh ont été mises en culture en présence de cycloheximide (inhibiteur de la synthèse protéique) et ensuite infectées avec le virus VIH-1, puis analysées par western blot. Une accélération de la dégradation de TRIM5 α a été observée. De plus, l'ajout de MG132, un inhibiteur de protéasome, prévient la dégradation de TRIM5 α suite à l'infection virale. Lors de la dégradation induite par le VIH, TRIM5 α est dépendant de l'activité du protéasome (Rold et Aiken, 2008).

1.3.5.8.3 Inhibition du transport de la capsid vers le noyau

Il est connu que la réplication des virions est bloquée avant l'accumulation des produits de transcription inverse (Stremlau et al., 2004). L'inhibition du protéasome abolit l'abilité de TRIM5 α à prévenir l'accumulation des produits de transcription inverse mais n'enlève pas la capacité de TRIM5 α à limiter les infections virales (Wu et al., 2006; Anderson et al., 2006). En effet, des cellules HeLa exprimant TRIM5 α rh ont été traitées avec l'inhibiteur de protéasome MG132 puis les produits de transcription inverse ont été analysés par PCR quantitative. Le niveau de produits de transcription inverse était augmenté comparativement à celui des cellules exprimant TRIM5 α rh non traitées au MG132. L'analyse en cytométrie de flux du nombre de cellules infectées à l'aide d'un gène rapporteur exprimant GFP a permis de déterminer qu'en présence de MG132, les cellules HeLa exprimant TRIM5 α rh sont tout de même aptes à restreindre le VIH-1 (Wu et al., 2006).

Suite à la transcription inverse, l'ADNc viral entre dans le noyau. Une proportion va former des cercles aberrants au lieu de s'intégrer dans le génome de la cellule cible. Ces cercles peuvent se former après recombinaison homologue ou par des jonctions bout-à-bout formant respectivement les cercles 1-LTR et 2-LTR (Figure 1.14). Comme ces cercles sont principalement formés dans le noyau, ils servent de marqueur de la localisation nucléaire de l'ADNc

viral. Bien que de perturber la fonction du protéasome restaure le niveau de produits tardifs de transcription inverse dans les cellules exprimant TRIM5 α rh, le niveau de cercles 2-LTR demeure quatre fois en dessous de celui des cellules contrôles même si les cercles 2-LTR ont été en partie secourus par traitement en MG132. Ceci suggère que le traitement au MG132 n'empêche pas la restriction par TRIM5 α rh mais plutôt arrête celle-ci après la production des produits tardifs de transcription inverse mais avant l'entrée complète dans le noyau, révélant une étape intermédiaire dans le mécanisme de restriction du VIH-1 par TRIM5 α rh (Wu et al., 2006).

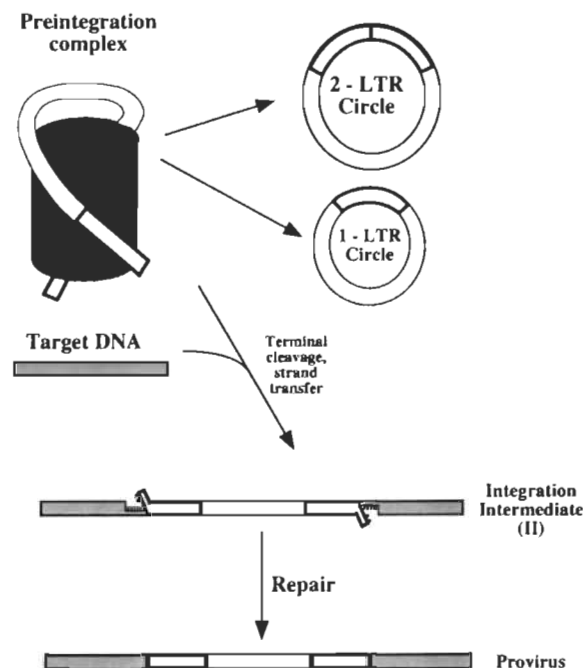


FIGURE 1.14 : Formes d'ADN_c rétroviraux produites après infection. Le génome rétroviral contenu dans le complexe de préintégration peut être intégré pour générer une intégration intermédiaire qui est ensuite réparée pour former le provirus. Alternativement, l'ADN_c peut être circularisé pour former les cercles 1-LTR et 2-LTR (Li et al., 2001).

1.3.5.8.4 Séquestration de la capside dans les corps cytoplasmiques de TRIM5 α

Les recherches préliminaires sur le rôle des corps cytoplasmiques dans la restriction ont démontré que les corps cytoplasmiques préexistants n'étaient pas requis pour la restriction par TRIM5 α (Song et al., 2005c). Pour l'étude de la localisation de TRIM5 α après l'addition de virus, des virus VIH-1 fusionnés à des fluorophores ont été utilisés. Les virus VIH-1 s'associent avec les corps cytoplasmiques de TRIM5 α rh tel qu'observé par microscopie sur des cellules fixées et cellules vivantes. De plus, l'inhibition du protéasome prévient la dégradation de la capside dans le cytoplasme et conduit à la séquestration du virus dans les corps cytoplasmiques. Collectivement, ces résultats suggèrent un modèle dans lequel l'association des corps cytoplasmiques et du VIH-1 est une étape intermédiaire dans le processus de restriction menant à la dégradation par le protéasome (Campbell et al., 2008).

1.3.5.9 Facteurs influençant la restriction par TRIM5 α

1.3.5.9.1 Interférons

Les interférons (IFN) font partie d'une famille de protéines sécrétées et multifonctionnelles qui exercent un large spectre de fonctions biologiques incluant a) des activités antivirales, b) antiprolifératives, c) antitumorales et d) immunomodulatoires (Asaoka et al., 2005). Ils sont subdivisés en deux types qui activent des voies de transduction via des récepteurs de surface cellulaire différents. Les interférons de type 1 sont un vaste groupe de cytokines produites par la plupart des cellules en réponse à l'infection virale. Ils déclenchent une cascade de signalisation qui conduit à l'induction de nombreux gènes qui contrôlent la réplication et la propagation du virus. Sont compris dans les interférons de type I les a) IFN- α , b) IFN- β , c) IFN- ω , d) IFN- ϵ et e) IFN- κ . Les

interférons de type II, aussi appelés interférons immunitaires, comprennent seulement un membre, l'IFN- γ . Il est produit par les lymphocytes T (CD4+ et CD8+) et les cellules NK (Carthagen et al., 2009).

Les gènes a) TRIM21, b) TRIM22 et c) TRIM34 sont régulés à la hausse par les interférons (Asaoka et al., 2005). Puisque TRIM5 α est situé dans la même région chromosomique 11p15 (Yamauchi et al., 2008), qu'il est adjacent et inversé au gène de TRIM22 (NCBI 2008) et qu'il partage la même région amplificatrice que TRIM22, il a alors été suspecté que l'expression de TRIM5 α était modulée par l'interféron. Il est connu que l'interféron peut stimuler la transcription de gènes via la séquence de l'élément de réponse stimulé par l'interféron (« interferon-stimulated response elements », ISRE). Un ISRE est présent dans les 40 paires de base en amont du site de transcription des gènes TRIM5 α hu et TRIM5 α rh. Pour déterminer si l'expression de TRIM5 α est modulée par l'interféron, l'équipe de Satoshi Inoue a analysé l'expression de l'ARNm de cellules HeLa et HepG2 (provenant d'une lignée cellulaire humaine cancéreuse hépatique) exprimant TRIM5 α hu par northern blot et par PCR quantitatif (réaction en chaîne de la polymérase) et montré que TRIM5 α est induit par les interférons de types I et II (Asaoka et al., 2005). Par la suite, il a été montré que TRIM5 α rh était induit par l'IFN- α dans les cellules de singe Rhésus (FrhK4). Lorsque traitées avec l'IFN- α et infectées par le VIH-1, les cellules FrhK4 présentent une augmentation de leur activité de restriction. Puisque l'IFN- α induit une série de facteurs antiviraux, ils ont donc cherché à savoir si l'augmentation de l'activité de restriction était due à TRIM5 α . En utilisant des « short hairpin-RNA » (shRNA) dirigés contre TRIM5 α , ils ont pu démontrer que TRIM5 α joue un rôle central dans la restriction du VIH-1 médiée par l'IFN- α dans les cellules FrhK4 (Sakuma et al., 2007).

1.3.5.9.2 Cyclophiline A

La cyclophiline A (CypA) appartient à la famille hautement conservée des cyclophilines. Cette famille est abondamment exprimée dans plusieurs tissus tant chez les organismes eucaryotes que procaryotes (Gothel et al. 1999). La relation entre CypA et le VIH-1 a une longue histoire. CypA est une enzyme cytoplasmique, une peptidyl-prolyl isomérase, qui effectue des isomérisations cis/trans. Lors de l'interaction entre la capside du VIH-1 et le site actif de CypA, la poche hydrophobe de CypA entre en contact direct avec les résidues G89 et P90 localisés sur une boucle flexible du domaine N-terminal de la capside (Pro-85-Pro93) (Gamble et al. 1996). La figure 1.15 présente la structure de la liaison de CypA avec la capside du VIH-1 (Bosco et al. 2002).

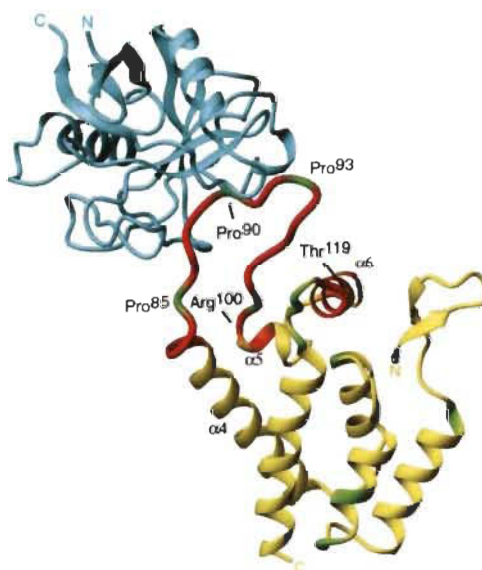


Figure 1.15 : Interaction entre CypA et la capside du VIH-1. CypA (bleu) est liée à la boucle flexible entre Pro-85 et Pro-93 de la capside (jaune). Les résidus catalysés par CypA sont représentés en rouge (Bosco et al., 2002).

CypA interagit avec gag dans les cellules infectées menant à son recrutement dans les nouveaux virions de VIH-1. Des résultats récents montrent que CypA interagit aussi avec les complexes de réplication entrant dans les cellules nouvellement infectées. Chez les singes du vieux monde, CypA diminue

l'infectivité mais seulement en présence de TRIM5 α . Bloquer l'activité de CypA en utilisant la cyclosporine A (CsA), un inhibiteur compétitif immunosupresseur, ou en réduisant l'expression de CypA par ARN interférence réduit la susceptibilité du VIH-1 à la restriction dans les singes du vieux monde et donc secourt l'infectivité du VIH-1 (Berthoux et al. 2005, Stremlau et al. 2006). Dans les cellules humaines, l'interaction entre le virus entrant et CypA est importante pour une infectivité maximale. Empêcher cette interaction réduit l'infectivité du VIH-1 indépendamment de l'expression de TRIM5 α (Towers 2007).

1.3.6 TRIMCyp

Chez les singes du nouveau monde, seul le singe-hibou est capable d'inhiber le VIH-1 (Hofmann et al. 1999). La restriction du VIH-1 chez ce singe est complètement abolie lorsque l'interaction entre la capsid du VIH-1 et CypA est rompue (soit par des mutations altérant la capsid ou par l'ajout de CsA aux cellules). Ce phénotype est l'opposé de celui rencontré dans la plupart des cellules humaines où l'interaction CypA-capsid est requise pour une réplication efficace du VIH-1 (Towers et al. 2003). La réponse paradoxale à la CsA retrouvée chez le singe-hibou a conduit à la découverte de TRIMCyp, une protéine de fusion. L'insertion par rétrotransposition d'un pseudogène dans l'intron 7 de TRIM5 α a remplacé le domaine SPRY de TRIM5 α par la séquence complète de la cyclophiline A (Figure 1.16). Cette fusion a toutes les caractéristiques d'un cas d'intégration d'ADN par la machinerie enzymatique de l'élément LINE-1. Ce facteur de restriction inhibe fortement a) le VIH-1, b) le SIVagm et c) le FIV (Diaz-Griffero et al. 2006a, Sayah et al., 2004).

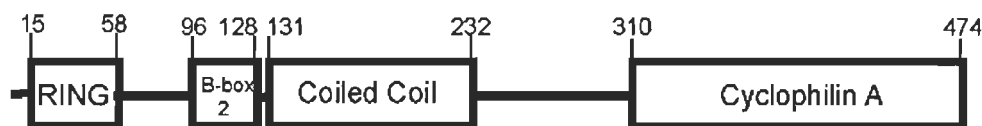


FIGURE 1.16 : Structure de TRIMCyp. TRIMCyp comprend un motif RBCC. Cependant, le domaine SPRY est remplacé par la séquence complète de la cyclophiline A. Les nombres représentent la position des acides aminés aux frontières de chaque domaine (Diaz-Griffero et al., 2006).

1.3.6.1 Comparaison de TRIM5α et TRIMCyp

Le facteur déterminant de la sensibilité virale à la restriction par TRIM5α et TRIMCyp est la protéine de capsid (Owens et al. 2003, Owens et al. 2004). Chez TRIM5α la liaison à la capsid s'effectue grâce au domaine SPRY (Sebastian et al., 2005) alors que chez TRIMCyp elle s'effectue grâce à la cyclophiline A (Sayah et al. 2004). Des études sur les niveaux de capsid du VIH-1 dans le cytoplasme de cellules exprimant TRIM5αrh et TRIMCyp ont montré qu'ils diminuent tous deux la quantité de capsides particulières (Diaz-Griffero et al. 2007). TRIMCyp provoquerait donc lui aussi une décapsidation précoce de la capsid. L'implication de chaque domaine dans la restriction par TRIM5αrh et TRIMCyp du FIV a été étudiée en utilisant des protéines mutantes ayant des domaines délétés. Les domaines RING et B-Box 2 sont requis pour une restriction efficace par TRIM5αrh. Contrairement à TRIM5α, la restriction du FIV par TRIMCyp ne nécessite pas les domaines RING et B-Box 2 pour une pleine activité. D'ailleurs, CypA et le linker 2 de TRIMCyp sont suffisant. En dépit de leur liaison différente à la capsid, la conséquence ultime de leur liaison à celle-ci semble être remarquablement similaire (Diaz-Griffero et al., 2006).

1.3.6.2 Nouveaux orthologues de TRIMCyp

Récemment, lors de la caractérisation du degré de polymorphisme chez le macaque Rhésus (*Macaca mulatta*) par séquençage de l'exon 8, l'existence de l'allèle de TRIM5 (*mamu7*) a été révélée. *Mamu7* a un changement de cadre de lecture dans l'exon 8 menant à un domaine SPRY tronqué de 59 acides aminés et à une mutation G→T dans le site d'épissage à la fin du sixième intron. L'inspection de la séquence a montré la présence de la séquence de Cyp en aval de TRIM5. La nouvelle protéine TRIMCyp, TRIMCyp^{rh}, est différente de TRIMCyp du singe hiboux car elle est codée par les exons 2 à 6 de TRIM5 et la séquence de la Cyp A remplace les exons 7 et 8. Il a aussi été montré que cet allèle de TRIMCyp peut inhiber la réplication virale des virus VIH-2 et FIV mais pas les virus VIH-2, SIV, EIAV et MLV. (Wilson et al., 2008)

Dans la recherche de lignées cellulaires sensibles aux infections rétrovirales, des fibroblastes dévirés du macaque à queue de cochon (*Macaca nemestrina*, pgt) présentaient des propriétés surprenantes : (1) le VIH-1 était particulièrement infectieux et (2) la CsA secourait l'infection par les virus VIH-2, SIV et FIV. La protéine TRIMCyp^{pgt} fut alors clonée. Celle-ci est codée par les exons 2 à 6 de TRIM5 α liés à la version complète de CypA. (Virgen et al. 2008)

Des études récentes ont montré que le macaque à queue de cochon n'exprime pas de TRIM5 α . Il exprime plutôt les nouveaux isoformes TRIM5 θ et TRIM5 η , incapables d'inhiber le VIH-1. La possibilité que TRIMCyp puisse compenser la perte d'activité de restriction médiée par TRIM5 α a alors été envisagée. Deux isoformes de la protéine TRIMCyp ont été trouvés. Le premier est présent chez le singe à queue de cochon (*Macaca nemestrina*) (Virgen et al. 2008 et Brennan et al. 2008), le second est retrouvé chez le singe à queue longue (*Macaca fascicularis*). Ces deux isoformes partagent un pourcentage d'homologie de 97%. (Brennan et al. 2008)

CHAPITRE 2

ÉTUDE DU COMPORTEMENT DE TRIM5 α ET TRIMCyp DANS LES CELLULES CANINES D17

2.1 Problématique

Dyana T. Saenz (de l'équipe de Éric M. Poeschla) a découvert que TRIM5 α rh n'est pas fonctionnel lorsqu'il est exprimé dans la lignée de cellules canines D17a (ostéosarcome) comparativement à la lignée de cellules humaines HT1080 (fibroblaste). En effet, il a été montré par cytométrie de flux que TRIM5 α inhibe le VIH environ 20 fois dans les cellules HT1080 alors qu'il est inhibé environ 2 fois dans les cellules D17 (Figure 2.1) (Saenz et al., 2005).

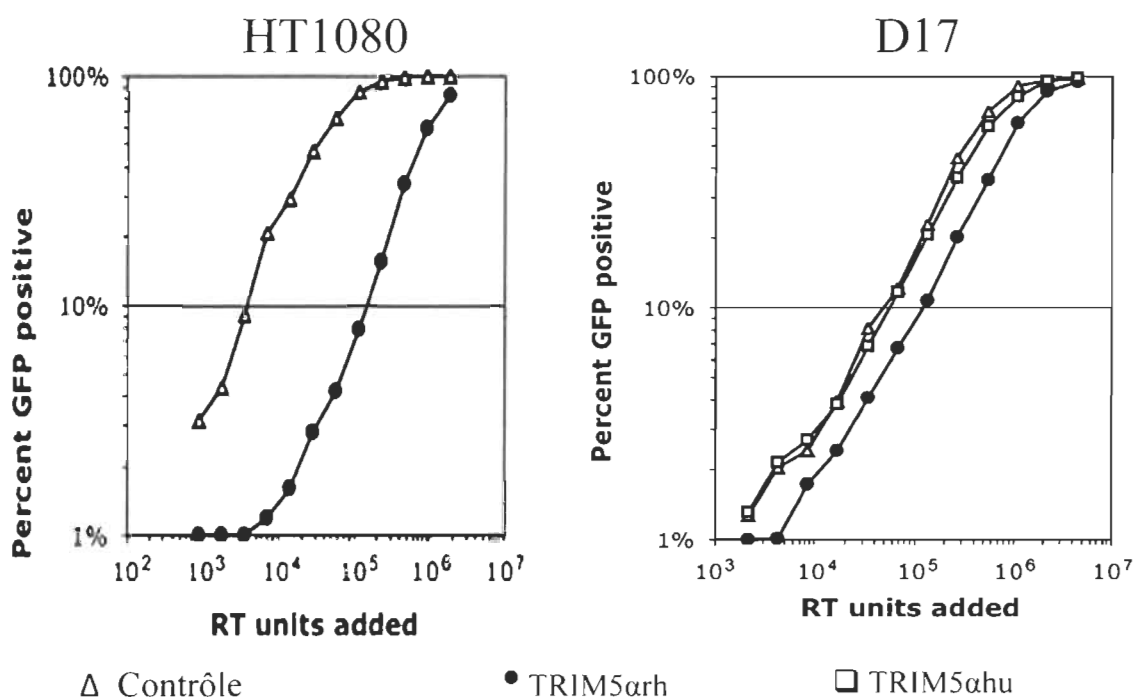


FIGURE 2.1 : Restriction par TRIM5 α dans les cellules humaines et canines. Le pourcentage de cellules infectées (GFP positives) est présenté versus le nombre d'unité de transcriptase inverse ajouté (Saenz et al., 2005).

Cette perte de fonction n'est pas due à la localisation ni au niveau d'expression de TRIM5 α car elle a montré que TRIM5 α était bien exprimée dans le cytoplasme par microscopie confocale à fluorescence et que la protéine était exprimée à des niveaux normaux, tel que démontré par Western Blot (Saenz et al., 2005).

Notre hypothèse de travail est que l'activité de TRIM5 α dépend de l'environnement cellulaire, c'est-à-dire de la présence d'autres facteurs cellulaires. Cette hypothèse s'appuie sur les résultats de Dyana T. Saenz ainsi que sur l'observation que la cyclophiline A est requise pour l'inhibition du VIH-1 chez les singes dit « du vieux monde » par TRIM5 α (Towers 2007). L'objectif principal est donc de caractériser une lignée cellulaire dans laquelle TRIM5 α ne présente pas d'activité de restriction (cellules D17) en étudiant la protéine elle-même ainsi que son interaction avec le virus.

2.2 Matériels utilisés

2.2.1 Souches bactériennes

Les bactéries utilisées sont les *E.coli* de souche DH5 α . Celles-ci sont employées pour la transformation des ADN.

2.2.2 Lignées cellulaires

Quatre lignées cellulaires ont été employées. Les HEK293T (293T), une lignée cellulaire fibroblastique embryonnaire humaine, sont facilement transfectables. Les MDTF sont des fibroblastes de la queue de souris. Les cellules Hela sont des cellules humaines tumorales issues d'un carcinome du col utérin. Finalement, les cellules D17 sont quant à elles des cellules canines d'ostéosarcome.

2.2.3 Enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont des enzymes bactériennes qui coupent la chaîne d'ADN. Elles reconnaissent des séquences cibles spécifiques. Les enzymes de restriction utilisées ici sont EcoR1 et Xho1. Ces enzymes viennent de la compagnie New England Biolabs (NEB).

2.2.4 Culture cellulaire

Le milieu de culture utilisé est le milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) contenant 2 mM de L-glutamine et 10 mM de tampon Hepes + rouge phénol. Il est additionné de sérum de veau fœtal (SVF) 10% (apportant les facteurs de croissance) et de 1% de pénicilline/streptomycine. Ces antibiotiques réduisent le risque de contamination bactérienne du milieu.

2.2.5 Les produits pharmaceutiques

Les produits pharmaceutiques employés lors de cette étude sont le MG132 de chez Sigma à 1µg/mL, la cyclosporine (CsA) de chez Sigma à 5µM, la puromycine de chez EMD Biosciences à 1µg/mL pour les cellules HeLa et D17 et à 3µg/mL pour les cellules MDTF, la nevirapine à 80µM et la cycloheximide de chez Sigma à 50mM. Les concentrations indiquées correspondent aux concentrations finales utilisées.

2.3 Méthodes utilisées

Plusieurs méthodes ont été utilisées lors de l'exécution de ce projet de recherche. La première section décrit la démarche expérimentale employée pour produire les ADN, les lignées cellulaires ainsi que les virus nécessaires au projet. Les différentes méthodes employées pour répondre à l'objectif 1

(caractériser l'activité de restriction de TRIM5 α et TRIMCyp dans les cellules D17) sont décrites à la section "Methods" de l'article débutant à la page 58.

2.3.1 Production des ADN_s plasmidiques

2.3.1.1 Culture bactérienne

La culture de bactéries a été faite dans du milieu Luria-Bertani (LB) 1X additionné d'ampicilline à une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$ sauf pour la production de bactéries compétentes (seulement du milieu LB 1X).

2.3.1.2 Bactéries compétentes

La culture bactérienne était de 1L au total. Puis, quatre lavages consécutifs ont été accomplis pour obtenir des bactéries compétentes concentrées 500 fois (volume final d'environ 2mL), utilisées lors de l'électroporation. Les quatre lavages des bactéries dans l'eau froide puis les trois lavages dans le glycérol 10% permettent de débarrasser celles-ci des sels contenus dans leur milieu de culture. Elles deviennent donc plus facilement transformables. Les bactéries compétentes sont conservées en aliquotes de 50 μL à une température de -80°C .

2.3.1.3 Transformations bactériennes

La méthode de transformation bactérienne employée est l'électroporation. Elle consiste à faire des pores dans la paroi bactérienne à l'aide d'un courant électrique. Cette modification de la paroi bactérienne est réversible et rend la paroi perméable à des molécules qui n'entreraient pas normalement, par exemple de l'ADN. Lors de l'électroporation, on utilise 50 μL de bactéries compétentes concentrées, des cuvettes 0,2 cm et un courant de 2,5 kV. Suite à l'électroporation, les bactéries sont placées dans un milieu SOC et incubées pendant 30 minutes à 37°C . Le milieu SOC est composé de bacto-tryptone

(20mg/mL), d'extrait de levures bacto-yeast extract (5mg/mL), de NaCl (0,5mg/mL), de glucose (3,6mg/mL) ainsi que de $MgCl_2$ (0,95mg/mL). Après l'incubation, les bactéries sont ensemencées sur des géloses LB 1X contenant de l'ampicilline 100 µg/mL qui sont incubées à 37°C pendant environ 16h.

2.3.1.4 Minipreps et Midipreps d'ADN

La purification de l'ADN plasmidique comporte plusieurs étapes. La première est une culture de bactéries transformées avec l'ADN voulu. Pour les minipreps, la culture est de 2 mL alors que pour les midipreps, le volume de culture est de 125 mL. Ensuite, la culture bactérienne subit une lyse cellulaire à l'aide d'un détergent. La troisième étape est la déprotéinisation. Ensuite, la purification est faite sur une colonne à base de silice. Pour les minipreps, l'ADN est élué dans un volume final de 30µL de Tris 10mM/EDTA 0,1 mM à pH 8,5 (TE) alors que pour les midipreps, l'ADN est élué dans un volume final de 600µL de TE. Les minipreps et midipreps sont obtenus respectivement à l'aide des troupes QIAquick Plasmid Miniprep kit et Hispeed Plasmid Midiprep kit. Ces kits proviennent de la compagnie QIAGEN.

2.3.1.5 Plasmide utilisé

Le plasmide utilisé est pMIP contenant l'insert TRIM5α-FLAG. Ce plasmide a été construit par Sarah Sebastian dans le laboratoire du Dr. Jeremy Luban (Sebastian et al. 2006). Le plasmide a une longueur de 8 000 paires de bases. La longueur de l'insert est variable selon l'allèle de TRIM5α utilisé.

Les lettres MIP signifient **M**SCV (« Murine Stem Cell Virus retroviral vector »), **I**RES (« internal ribosomal entry site »), **P**uromycin (gène de résistance à la puromycine). Le IRES permet d'exprimer deux protéines à partir d'un seul ARNm, soit dans ce cas, la protéine TRIM5α et le gène de résistance

à la puromycine. pMIP contient aussi un gène de résistance à amplicilline pour une sélection lorsqu'il est exprimé dans *E.coli*. Le plasmide possède deux Long Terminal Repeats (LTR), qui sont des séquences répétées. Elles contiennent un promoteur rétroviral et sont indispensables pour la transcription inverse. Les LTR sont aussi impliquées dans l'intégration de l'ADN double brin, produit de la transcription inverse, dans le génome de l'hôte.

L'insert possède à son extrémité C-terminale un épitope (FLAG). En amont de l'insert, un site de restriction pour l'enzyme Xho1 et en aval du FLAG, un site de restriction pour l'enzyme EcoR1 ont été introduits. Le FLAG peut être reconnu par un anticorps anti-FLAG lors d'analyses comme le Western Blot.

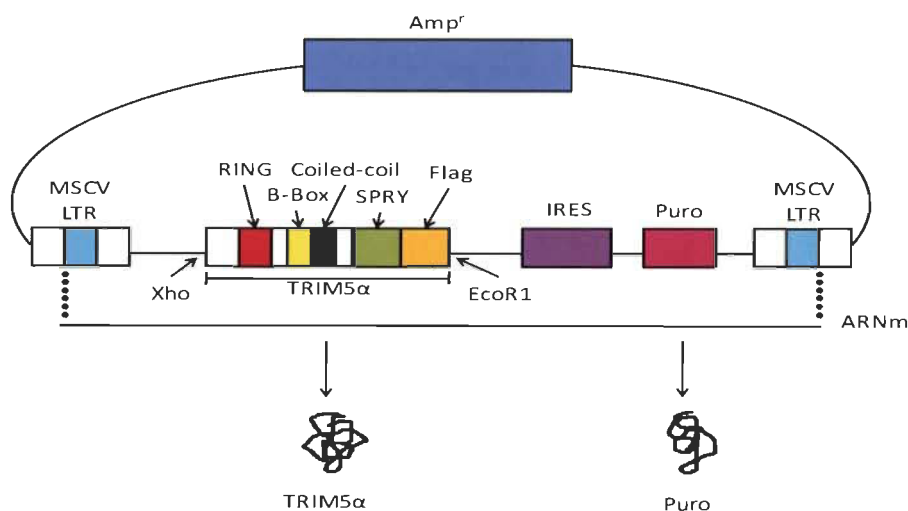


Figure 2.2 : Plasmide pMIP. Présentation des constituants du plasmide pMIP ainsi que les produits de la traduction de son ARNm menant à la protéine TRIM5 α -Flag et au gène de résistance à la puromycine.

2.3.2 Production de virus

2.3.2.1 Virus pMIP-TRIM5 α -FLAG

Pour la production du virus pMIP-TRIM5 α -FLAG les ADN_s suivants ont été utilisés: pCL-Eco, pCMDG et pMIP-TRIM5 α -FLAG. pCL-Eco et pCMDG codent respectivement pour gag+pol (protéines de structures et enzyme) de MLV et pour l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire. La technique employée pour produire ce virus est la transfection des cellules 293T par la méthode Polyéthylénimine (PEI). La transfection s'effectue sur une culture en boîte de 10 centimètres à confluence de 80-90%. 5 μ g de pCMDG, 10 μ g de pCL-Eco et 10 μ g de pMIP-TRIM5 α sont dilués dans 1mL de DMEM sans SFV et 45 μ L de PEI (Polysciences Inc.). Le mélange est vortexé puis incubé 10 minutes à température pièce. Il est ensuite ajouté goutte à goutte aux cellules. Le milieu est changé 16 à 24 heures après la transfection. Puis, la récolte du virus s'effectue 48 heures après la transfection en recueillant le surnageant cellulaire. Le surnageant est centrifugé pour débarrasser le virus des débris cellulaires. Le virus est conservé en aliquotes de 1mL à -80°C .

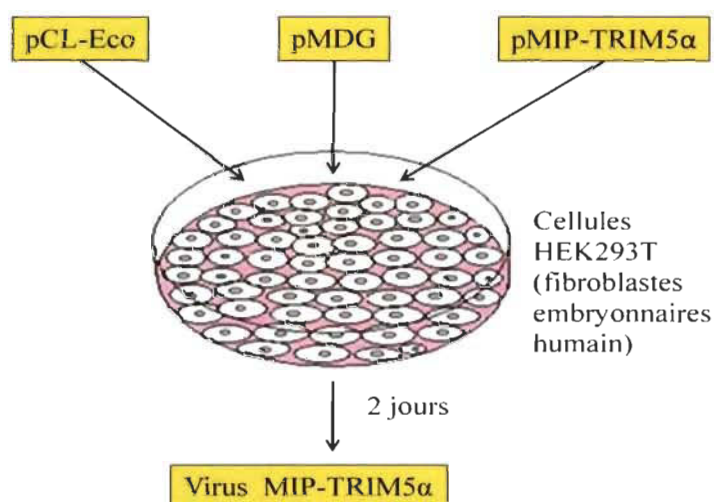


Figure 2.3 : Production de virus pMIP-TRIM5 α . Les 3 ADN sont mélangés puis introduits dans les cellules par la méthode PEI. Après deux jours d'incubation, le virus peut être récolté.

2.3.2.2 Virus VIH-1 GFP

Pour la production du virus VIH-1 GFP, la même technique a été utilisée. Cependant les ADN étaient pCMDG (5µg) qui code pour l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire, CMVΔR8.9 (10µg) qui code pour les gènes gag et pol du VIH-1 et TRIP-CMV-GFP (10µg) qui code pour GFP.

2.3.2.3 Transduction de cellules par le virus pMIP-TRIM5α-FLAG

Les cultures cellulaires ont été préparées dans des plaques 6 puits avec 142 500 cellules par puits pour les *MDTF* et 285 000 cellules par puits pour les cellules *HeLa* et *D17*. Les cellules ont ensuite été infectées par les virus pMIP-TRIM5α-FLAG. Suite à l'infection, les cellules résistantes à la puromycine sont sélectionnées par traitement à la puromycine pendant 1 à 4 jours. Pour les *MDTF*, 3µg/mL de puromycine ont été utilisés alors que pour les *HeLa* et les *D17*, 1µg/mL a été utilisé. Ce traitement va permettre de tuer toutes les cellules n'exprimant pas le gène de résistance à la puromycine et donc n'ayant pas été transduites par MIP-TRIM5α.

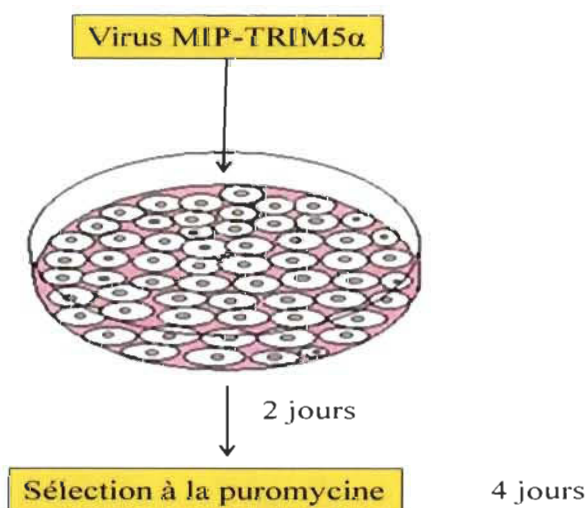


Figure 2.4 : Production des lignées cellulaires exprimant TRIM5α. Les cellules sont recouvertes de virus puis incubées pendant 2 jours. Ensuite, elles subissent un traitement à la puromycine pour sélectionner les cellules exprimant TRIM5α.

2.4 Résultats

Published in Retrovirology,

Both TRIM5 α and TRIMCyp have only weak antiviral activity in canine D17 cells

Julie Bérubé¹, Amélie Bouchard¹, Lionel Berthoux^{1,2}

¹Laboratory of Retrovirology, University of Québec, Trois-Rivières, QC G9A 5H7, Canada

²Corresponding author

Email addresses:

julie.berube1@uqtr.ca

amelie.bouchard1@uqtr.ca

lionel.berthoux@uqtr.ca

Le manuscrit a été rédigé par M. Lionel Berthoux. L'ensemble du travail expérimental a été réalisé par Mme Julie Bérubé mais il convient de mentionner que l'expérience de microscopie présentée à la figure 1B a été réalisée par Mme Amélie Bouchard. De plus, les figures présentes dans l'article ont été produites par Mme Julie Bérubé.

Abstract

Background. TRIM5 α , which is expressed in most primates, and the related TRIMCyp, which has been found in one of the New World monkey species, are antiviral proteins of the TRIM5 family that are able to intercept incoming retroviruses early after their entry into cells. The mechanism of action has been partially elucidated for TRIM5 α , which seems to promote premature decapsidation of the restricted retroviruses. In addition, through its N-terminal RING domain, TRIM5 α may sensitize retroviruses to proteasome-mediated degradation. TRIM5 α -mediated restriction requires a physical interaction with the capsid protein of targeted retroviruses. It is unclear whether other cellular proteins are involved in the inhibition mediated by TRIM5 α and TRIMCyp. A previous report suggested that the inhibition of HIV-1 by the rhesus macaque orthologue of TRIM5 α was inefficient in canine cell line (D17a cells), suggesting that the cellular environment was important for the restriction mechanism. Here we investigated further the behavior of TRIM5 α and TRIMCyp in the D17 cells.

Results. We found that the various TRIM5 α orthologues studied (human, rhesus macaque, African green monkey) as well as TRIMCyp had poor antiviral activity in the D17 cells, despite seemingly normal expression levels and subcellular distribution. Restriction of both HIV-1 and the distantly related N-tropic murine leukemia virus was low in D17 cells. Both TRIM5 α_{rh} and TRIMCyp promoted early HIV-1 decapsidation in murine MDTF cells (used as control), but weak levels of restriction in D17 cells correlated with the absence of accelerated decapsidation in these cells and also correlated with normal levels of cDNA synthesis. Fv1, a murine restriction factor structurally unrelated to TRIM5 α , was fully functional in D17 cells, showing that the loss of activity was specific to TRIM5 α /TRIMCyp.

Conclusions. We show that D17 cells provide a poor environment for the inhibition of retroviral replication by proteins of the TRIM5 family. Because both TRIM5 α and TRIMCyp are poorly active in these cells, despite having quite different viral target recognition domains, we conclude that a step either upstream or downstream of target recognition is impaired. We speculate that an unknown factor required for TRIM5 α and TRIMCyp activity is missing or inadequately expressed in D17 cells.

Background

TRIM5 α is a primate protein expressed in the cytoplasm of many cell types that is able to inhibit ("restrict") the replication of selected retroviruses [1-3]. Individual *TRIM5 α* alleles are able to restrict a few or many retroviruses (although never all of them). The specificity of the restriction, i.e. the viral targets for each particular *TRIM5 α* allele, is species-dependent more than it is cell type-dependent. The specific recognition of viral targets is determined by the SPRY/B30.2 region at the C-terminus of TRIM5 α [4-9]. On the virus side, capsid (CA) proteins seem to be the only determinant of sensitivity to TRIM5 α [10-12], and a physical interaction takes place between TRIM5 α and CA, as evidenced by pull-down assays [13, 14]. It is worth noting, however, that the interaction has not yet been documented using purified TRIM5 α , and thus it is possible that other cellular factors are relevant to this step. TRIM5 α forms trimers and possibly multimers of higher orders of complexity [15, 16]. TRIM5 α multimerization is linked to its restriction activity [17]. In addition, TRIM5 α targets multimers of properly matured and assembled retroviral CA constituting the CA core of incoming viral particles [18, 19]. Thus, the initial TRIM5 α -retrovirus interaction might involve the assembly of a multimer of TRIM5 α around the CA core of incoming retroviruses very early after entry.

Following this initial interaction, replication of the restricted retrovirus can be impaired in several ways. First, TRIM5 α_{rh} and TRIM5 α_{hu} seem to promote premature decapsidation of HIV-1 and N-tropic murine leukemia virus (N-MLV), respectively [14, 20]. More specifically, TRIM5 α causes post-entry disappearance of CA in its particulate form, which is assumed to belong to not-yet-disassembled viruses. Second, replication is inhibited by a mechanism involving the proteasome. This is evidenced by the partial rescue of retroviral replication from TRIM5 α restriction in the presence of the proteasome inhibitor MG132 [21, 22]. In addition, the ubiquitin ligase activity associated with the RING domain of TRIM5 α is important for full restriction activity [3]. It has also been proposed recently that TRIM5 α_{rh} might promote the degradation of HIV-1 CA through a non-proteasomal, non-lysosomal pathway [23]. Thirdly, TRIM5 α interferes with the nuclear transport of retroviral pre-integration complexes [21, 22]. TRIM5 α from the squirrel monkey seems to restrict the mac251 strain of simian immunodeficiency virus (SIVmac251) mostly, if not only, by inhibiting this nuclear transport step [24].

Interestingly, a recent report pointed to late steps of retroviral replication (i.e. assembly and release) as possibly targeted by TRIM5 α , although the molecular basis for late-stage restriction specificity is distinct from that of early stages [25].

In the owl monkey, a New World species, the SPRY/B30.2 domain of TRIM5 α is replaced by the full coding sequence of the highly conserved, ubiquitously expressed peptidyl-prolyl isomerase Cyclophilin A (CypA), yielding a protein called TRIMCyp or TRIM5-CypA [26, 27]. TRIMCyp inhibits HIV-1, the African green monkey strain of SIV (SIV_{AGM}), feline immunodeficiency virus (FIV) and equine infectious anemia virus (EIAV) [28-30]. CypA was isolated fifteen years ago as a cellular protein interacting with HIV-1 CA [31] and

TRIMCyp binds CA through its CypA domain [27,28]. CypA-CA interaction and TRIMCyp-mediated restriction are abrogated in the presence of cyclosporine (CsA), a drug that targets the same structural motif in CypA to which CA binds [27,32]. Like TRIM5 α_{rh} , TRIMCyp causes an early block to HIV-1 replication, preventing the accumulation of retroviral cDNA in the infected cells [16, 28, 33]. Prior to the present work, however, it was not known whether TRIMCyp promoted HIV-1 premature decapsidation.

Are other cellular factors important for the restriction mediated by TRIM5 α ? Efficient inhibition of HIV-1 by TRIM5 α in several Old World monkey cell lines requires the presence of CypA, as seen by gene knock-down [34, 35]. The proposed model [34] is that CypA catalyzes the cis-trans isomerization of HIV-1 CA at proline 90 [36], thus turning it into a target for some simian TRIM5 α orthologues. However, the impact of CypA on the restriction of HIV-1 is much less significant when TRIM5 α is over-expressed in non-primate cells [34, 35, 37]. It is not clear whether other cellular proteins are important in the steps leading to the initial viral recognition step. Downstream of this TRIM5 α -target interaction, it is expected that cellular proteins take part in the targeting of restricted viruses to proteasome-dependent degradation, although the exact mechanism has not been elucidated yet. Whether cellular proteins other than TRIM5 α are also required for CA premature decapsidation and the inhibition of nuclear transport is totally unknown.

The restriction phenotype stemming from TRIM5 α and TRIMCyp activity is retained upon expression of these proteins in non-primate cells such as murine and feline cells, suggesting that if cellular factors other than TRIM5 α are required, they must be widely conserved among mammals. However, the Poeschla group recently reported that restriction of HIV-1 by the rhesus macaque TRIM5 α orthologue was inefficient in D17 cells, a canine

osteosarcoma cell line [38]. As a first step toward the isolation of additional factors involved in the restriction by TRIM5 α , we decided to characterize further the restriction phenotype in the D17 cells.

Results

We transduced C-terminal FLAG versions of TRIM5 α (rhesus macaque, African green monkey, and human) and TRIMCyp (owl monkey) into mouse *mus dunni* tail fibroblasts (MDTF) and D17 cells. Cell lines homogeneously expressing each TRIM5 orthologue were obtained following puromycin treatment. Steady-state levels of TRIM5 expression were similar in MDTF and D17 cells, as judged by western blotting (Fig. 1A). Curiously, we could not detect the human TRIM5 α orthologue in either cell line. However, N-tropic murine leukemia virus (N-MLV) was restricted in the MDTF cells expressing TRIM5 α_{hu} as expected (Fig. 2), and sequencing analysis of pMIP-TRIM5 α_{hu} confirmed the presence of the FLAG tag. Thus, it appears that TRIM5 α_{hu} -FLAG has constitutively small steady-state expression levels, an observation previously made by others [37]. We used immunofluorescence (IF) microscopy to analyze the subcellular distribution of TRIM5 α_{rh} and TRIMCyp in MDTF cells and in D17 cells (Fig. 1B). Both proteins were cytoplasmic and formed bodies in the two cell types. Thus, expression and localization of TRIM5 α and TRIMCyp were seemingly normal in the D17 cells.

We then challenged the cell lines generated with N-MLV and B-MLV vectors expressing GFP. Upon infection with multiple virus doses, we found as expected that N-MLV was 10- to 12-fold less infectious in the MDTF cells expressing the human or African green monkey orthologues of TRIM5 α , compared with the control cells (Fig. 2A). In the D17 cells, however, the

magnitude of restriction by TRIM5 α_{hu} or TRIM5 α_{AGM} was only to 2- to 3-fold. As expected, B-tropic MLV replication was not affected by any of the TRIM5 α orthologues. In an independent experiment, we infected all the MDTF and D17 cell lines generated with N-MLV_{GFP} and B-MLV_{GFP} at a single virus dose. TRIM5 α_{AGM} and TRIM5 α_{rh} each inhibited N-MLV infection by about 100-fold in the MDTF cells, and TRIM5 α_{hu} had an even greater inhibitory effect (Fig. 2B). In contrast, restriction in the D17 cells was much smaller (about 10-fold) (Fig. 2B). As expected, N-MLV was not inhibited by TRIMCyp and B-MLV was not inhibited by either TRIM5 α or TRIMCyp.

We next investigated the levels of restriction of HIV-1 in the various cell lines. Upon challenge at multiple virus doses, we found HIV-1_{GFP} to be strongly inhibited (about 100-fold; Fig. 3A) in the MDTF cells expressing either TRIM5 α_{rh} or TRIMCyp, as expected. In contrast, the level of restriction by these TRIM5 proteins was much smaller in the D17 cells (about 3-fold). In another experiment, we infected MDTF, HeLa, and D17 cells expressing either TRIM5 α_{rh} or TRIMCyp with HIV-1_{GFP} at a fixed virus dose. In these conditions, we found that TRIM5 α_{rh} and TRIMCyp caused a \approx 100-fold decrease in infection by HIV-1_{GFP} in MDTF or HeLa cells. In D17 cells, however, the decrease was of only 5-fold. Thus, restriction of both N-MLV and HIV-1 by either TRIM5 α or TRIMCyp was inefficient in the D17 cells.

Restriction of lentiviruses by TRIMCyp is abrogated in the presence of cyclosporine A (CsA), a competitive inhibitor of cyclophilins. We reasoned that if TRIMCyp inhibited HIV-1 more efficiently in MDTF cells compared to the D17 cells, then the level of enhancement of HIV-1 infection by CsA should also be greater. Thus, we infected MDTF and D17 cells at a multiplicity of infection (MOI) of 1 to 3 % infected cells and in the presence of increasing CsA concentrations. In the MDTF-TRIMCyp, CsA enhanced HIV-1 infection by 60-

fold (Fig. 4), consistent with the high level of restriction in these cells. In contrast, CsA-mediated enhancement of HIV-1 replication in D17-TRIMCyp cells was much less (5-fold). We performed an additional experiment using an optimal CsA concentration (6 μ M) and a multiple MOIs (Fig. 4B). CsA completely abrogated TRIMCyp-mediated restriction in both MDTF and D17 cells, but the magnitude of CsA-mediated enhancement of HIV-1 replication was about 20-fold greater in MDTF-TRIMCyp cells compared to D17-TRIMCyp.

Restriction of both HIV-1 and N-MLV by TRIM5 α has been associated with a loss of particulate CA [14, 20]. Post-entry particulate CA is believed to be a marker of viruses not yet disassembled, as disassembly of the retroviral core leads to increased CA solubility. Using a 50% sucrose cushion, we separated particulate CA from soluble CA following HIV-1 virus-like particles (VLPs) infection of MDTF and D17 cells expressing TRIM5 α_{rh} or TRIMCyp. Examination of CA in whole lysates and in soluble "supernatant" fractions revealed a larger amount of CA in D17 cells compared with the MDTF cells (Fig. 5). Presumably, this could be due to more efficient virus entry in the D17 cells. Uncleaved Gag proteins and Gag maturation intermediates were detected in whole lysates and in some pellets, but this observation did not fit any obvious trend and had low reproducibility (not shown). As expected, there was a decrease (6-fold) in particulate CA in the MDTF-TRIM5 α_{rh} cells, compared with the control MDTF cells. The same phenotype was observed in the MDTF-TRIMCyp cells, indicating that TRIM5 α and TRIMCyp, despite differences in the CA-binding region, inhibit retroviral replication through similar mechanisms. We also noted that the decrease in particulate CA was not accompanied by an obvious increase in soluble CA (Fig. 5 and Fig. 6). In the D17 cells, TRIM5 α_{rh} and TRIMCyp both decreased the levels of particulate HIV-1 CA compared with the control cells, but the magnitude of the effect was significantly lesser than in the MDTF cells.

Both TRIMCyp-mediated restriction of HIV-1 and enhancement of HIV-1 replication by CsA are more efficient in the MDTF cells compared with the D17 cells (Fig. 3 and 4). Thus, we examined the effect of CsA on the levels of particulate CA in the MDTF-TRIMCyp and D17-TRIMCyp cells (Fig. 6). Like before, the decrease in particulate CA caused by TRIMCyp was more acute in the MDTF cells compared with the D17 cells (5-fold versus 1.6-fold). In addition, CsA restored wild-type levels of particulate CA in both cell types, although, as expected, the magnitude of this effect was greater in the MDTF cells.

TRIM5 α_{rh} and TRIMCyp both inhibit HIV-1 cDNA accumulation in their cognate species and this phenotype is maintained upon expression in non-primate cells. We used standard PCR and real-time PCR to analyze the levels of HIV-1 cDNA after a 12-hours HIV-1_{GFP} infection of MDTF and D17 cells expressing TRIM5 α_{rh} or TRIMCyp (Fig. 7). The oligodeoxynucleotide pair used amplified a sequence within the GFP cDNA. Compared with control cells, both TRIM5 α_{rh} and TRIMCyp caused a sharp decrease in the accumulation of viral cDNA in the MDTF cells. As expected, CsA rescued HIV-1 cDNA synthesis to near-normal levels. On the other hand, TRIM5 α_{rh} and TRIMCyp caused little or no decrease in HIV-1 cDNA levels in D17 cells and CsA had little or no effect on the levels of cDNA in the D17-TRIMCyp cells (Fig. 7).

Fv1, the murine retroviral restriction factor described and cloned decades ago [40,41], also targets incoming retroviruses at an early post-entry step. Although *fv1* is related to the *gag* region of murine endogenous retroviruses and bears no immediate similarities to TRIM5, residues in MLV CA proteins are determinants in both Fv1 and TRIM5 α -mediated restrictions [42]. Consequently, Fv1 and TRIM5 α compete with one another for the binding to putative restriction targets when co-expressed in the same cells [43]. We transduced the N-MLV-targeting Fv1^b in both D17 and MDTF cells and monitored the effect of its

expression on the replication of N-MLV and, as a control, B-MLV (Fig. 8). As expected, Fv1^b strongly inhibited N-MLV in the MDTF cells (more than 100-fold) while it had little effect on B-MLV. Restriction of N-MLV in D17-Fv1^b cells was efficient, albeit slightly less so than in MDTF-Fv1^b cells. Thus loss of restriction activity in D17 cells seems to be specific to TRIM5 α .

Discussion

The mechanism by which TRIM5 α and TRIMCyp intercept and inhibit incoming retroviruses is incompletely understood. TRIM5 α is able to trimerize in cells, and it is probably in this form (or as a multimer of higher complexity) that it recognizes its viral target [15, 17]. This initial interaction is followed by the disappearance of particulate CA but not soluble CA. The loss of particulate CA has been attributed to an acceleration of viral uncoating in restrictive conditions [14, 20]. However, as observed here and by others [14], the decrease in particulate HIV-1 CA in restrictive conditions is not necessarily accompanied by an increase in soluble CA. Thus, it remains possible that incoming retroviral cores are not disassembled faster under TRIM5 α /TRIMCyp restriction but instead are specifically targeted to a degradation pathway. Accordingly, pharmacological approaches have revealed a role for the proteasome in the restriction mediated by TRIM5 α [21, 22]. Of course, the two models are not mutually exclusive, as proteasome-mediated degradation might well follow premature decapsidation.

We find retroviral restrictions mediated by either TRIM5 α or TRIMCyp (but not Fv1) to be poorly efficient in the canine cells D17. These results confirm and extend previous findings by Saez and colleagues [38]. The restriction defect did not appear to be caused by poor expression or mislocalization of TRIM5 α or

TRIMCyp. Consistent with the HIV-1_{GFP} transduction data, TRIM5 α and TRIMCyp had little effect on the accumulation of HIV-1 cDNA in D17 cells. In addition, TRIM5 α and TRIMCyp induced the disappearance of HIV-1 particulate CA at relatively low rates in D17 cells, compared with the MDTF cells. Therefore, D17 cells provided a poor environment for the restriction. We hypothesize that a cellular factor important for the activity of TRIM5 α and TRIMCyp is not functional or is expressed at low levels in these cells. The missing factor might be important for TRIM5 multimerization or for its interaction with the proteasome. Conversely, a dominant negative factor might be expressed in the D17 cells. That both N-MLV and HIV-1 were less restricted in D17 cells implies that CypA is not relevant to the observed phenotype. Reciprocally, it is unlikely that the SPRY/B30.2 domain of TRIM5 α is relevant to its loss of function in the D17 cells, since a similar effect was observed with TRIMCyp.

Conclusions

The canine D17 cells offer a cellular context that is unfavorable to the restriction mechanism mediated by TRIM5 α and TRIMCyp. This cell line may thus represent a unique opportunity to isolate and characterize cellular genes regulating retroviral restrictions.

Methods

Plasmid DNAs. pMIP-TRIM5 α_{rh} -FLAG, pMIP-TRIM5 α_{AGM} -FLAG, pMIP-TRIM5 α_{hu} -FLAG, and pMIP-TRIMCyp-FLAG express C-terminal FLAG tagged versions of cDNAs amplified respectively from rhesus macaque FRhK4 cells, African green monkey Vero cells, human TE671 cells, or owl monkey OMK cells,

and were generous gifts from Jeremy Luban [39]. pCLNCX-Fv1^b [43], which encodes both Fv1^b and the red fluorescent protein (RFP), was a kind gift of Greg Towers (University College, London). pMD-G, pΔR8.9, pTRIP-CMV-GFP, pCL-Eco, pCIG3N, pCIG3B and pCNCG have all been extensively described before [44-49].

Cells and virus production. Human embryonic kidney 293T, human cervical epithelial carcinoma cells HeLa, *mus dunni* tail fibroblasts (MDTF; a gift from Jeremy Luban) and canine osteosarcoma D17 cells (a kind gift from Monical Roth) were all grown in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. All viruses used in this study were produced through transient transfection of 293T cells using polyethylenimine. For that, a mixture of the appropriate DNAs diluted in 1 ml of DMEM without serum or antibiotics was mixed with 45 µl of a 1 mg/ml solution of polyethylenimine (Polysciences). This transfection mix was then added to 70% confluent 293T cells in a 10-cm tissue culture dish. The next day, cells were PBS-washed once and put back in culture in fresh medium. 2 days after transfection, virus-containing supernatants were collected, clarified by low-speed centrifugation and stored in 1-ml aliquots at -80°C.

To produce the MIP vectors used to transduce the various *TRIM5* alleles, the transfection mix included 10 µg of pCL-Eco, 5 µg of pMD-G, and 10 µg of the appropriate pMIP construct. To produce the N-MLV_{GFP} and B-MLV_{GFP} vectors, the transfection mix included 10 µg of pCIG3 N or B, 5 µg of pMD-G, and 10 µg of pCNCG. To produce the HIV-1_{GFP} vector, cells were transfected with 10 µg of pΔR8.9, 5 µg of pMD-G, and 10 µg of pTRIP-CMV-GFP.

TRIM5-expressing cell lines. HeLa and D17 cells were plated at 300,000 cells per well and MDTF cells were plated at 140,000 cells per well in 6-well plates. The next day, supernatants were aspirated and replaced with MIP-TRIM5 α or MIP-TRIMCyp vector preparations (2 ml per well). 2 days later, cells were placed in medium containing 1 μ g/ml (HeLa, D17) or 3 μ g/ml (MDTF) of puromycin (EMD Biosciences). These puromycin concentrations were determined to kill all sensitive cells after one or two days of treatment. Puromycin selection was allowed to proceed for 4 days, and then again periodically during the course of this work. Expression of the transduced TRIM5 cDNAs was analyzed by western blotting, using antibodies directed against the FLAG epitope (mouse monoclonal; Sigma) or actin (goat polyclonal; Santa Cruz).

Viral challenges. Cells were plated at 25,000 cells (HeLa, D17) or 10,000 cells (MDTF) in 0.4 ml per well of 24-well plates. Cells were infected the next day with HIV-1_{GFP}, N-MLV_{GFP}, or B-MLV_{GFP} vectors. When CsA (Sigma) or nevirapine were used, they were added 15 min prior to the virus. Cell supernatants were replaced with fresh medium without drugs 16 h after infection. 2 days after infection, cells were trypsinized and fixed in 2% formaldehyde-PBS. Flow cytometry was done on a FC500 MPL instrument (Beckman Coulter) using the CXP software for analysis. Intact cells were identified based on light scatter profiles, and only those cells were included in the analysis. Ten thousand cells per sample were processed, and cells positive for GFP expression were gated and counted as a percentage of total intact cells. False-positive results were insignificant, as shown by controls corresponding to uninfected cells (not shown).

IF microscopy. Cells were plated at 24,000 (MDTF) or 50,000 (D17) on LabTek II four-chamber slides (LabTek). The next day, cells were washed with

PBS, fixed for 30 min in 4 % formaldehyde-PBS, washed three times in PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 2 min on ice. Cells were then washed again with PBS and treated with 50 mM NH_4Cl (in PBS) for 10 min at RT. Then, cells were washed 3 times in PBS and treated with 10% normal goat serum (Vector laboratories) for 30 min at RT. This saturation step was followed by incubation with an antibody against FLAG (M2 mouse monoclonal; Sigma) at a 1:400 dilution in PBS with 10% normal goat serum. Fluorescent staining was done using an Alexa488-conjugated goat anti-mouse antibody (Molecular Probes) at a 1:500 dilution. Cells were washed 4 times in PBS before mounting in Vectashield (Vector Laboratories). Hoechst33342 (0.8 $\mu\text{g/ml}$; Molecular Probes) was added along with the penultimate PBS wash to reveal DNA. Pictures were generated using a Olympus BX-60 microscope with the Image-Pro Express software.

Fate-of-capsid assay. The protocol used was adapted from Stremlau et al [14]. Cells were plated at 80% confluence in 10-cm culture dishes. 12 hours later, they were layered with 8 ml of HIV-1 VLPs, which is a high MOI (equivalent to 50-80% infected control cells by HIV-1_{GFP}). VLP infections were performed in the presence or absence of nevirapine (80 μM) or CsA (5 μM). 4 hours later, supernatants were replaced with fresh media containing the appropriate drugs and the cells were put back in culture for an additional 2 hours. Cells were then lysed in 1.5 ml of a hypotonic lysis buffer (100 μM Tris-Cl pH8.0, 0.4 mM KCl, 2 μM EDTA) containing a protease inhibitor mix (Sigma). After Dounce homogenization (15 strokes) and clarification by low-speed centrifugation, 50 μl of the lysate were saved ("whole lysate"), and 1 ml was layered on top of a 50% sucrose cushion prepared in PBS. Particulate CA was sedimented by ultracentrifugation using a Beckman SW41Ti rotor. The centrifugation was carried in Beckman Ultraclear tubes for 2 hours at 32,000 rpm and at 4°C. Following this step, 200 μl of the supernatants were carefully transferred to a fresh tube and lysed in SDS sample buffer. Remaining

supernatant and sucrose cushions were discarded by carefully inverting the tubes, and pellets were resuspended in 50 μ l of SDS sample buffer. Equal volumes of whole cell lysate, supernatant, and pellet fractions were processed for western blotting using a anti-CA mouse monoclonal antibody (clone 183; a gift of Jeremy Luban)

Monitoring HIV-1 cDNA synthesis. 50,000 cells (D17) or 20,000 cells (MDTF) were plated in 0.4 ml per well in 24-well plates. 12 hours later, cells were infected with 10 μ l HIV-1_{GFP} that had been treated with DNase I (NEB; 23 U/ml of virus preparation) for 10 min at 25°C. Cells were washed with PBS and trypsinized after 12 hours of infection. Total cellular DNA was extracted using the DNeasy kit (Qiagen) and digested for one hour at 37°C with Dpn1 to further reduce contamination of the samples with plasmid DNA. Aliquots (5 μ l out of 200 μ l) of each sample were submitted to a 30-cycle PCR analysis using the following oligodeoxynucleotides: GFPs, 5'-GACGACGGCAACTACAAGAC and GFPas, 5'-TCGTCCATGCCGAGAGTGAT. PCR products were separated on a 2% agarose-TAE gel, and revealed with ethidium bromide staining. For real-time PCR analysis, 2 μ l of each DNA preparation were subjected to a 45-cycle PCR in 20 μ l total volume containing 10 μ l of QuantiTect SYBR Green PCR master mix (Qiagen). Amplification curves were analyzed with Light Cycler relative quantification software v1.0, and quantifications were determined relative to dilutions of pTRIP-CMV-GFP.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LB and JB designed the study. JB and AB performed experiments. LB and JB drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Jeremy Luban for the generous gift of reagents. We also thank Valérie Leblanc and Marie-Claude Déry for their help with real-time PCR analysis and IF microscopy. Nevirapine was obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research, Institute of Infection and Immunity.

References

1. Perez O, Hope TJ: **Cellular restriction factors affecting the early stages of HIV replication.** *Curr HIV/AIDS Rep* 2006, **3**:20-25.
2. Towers GJ: **Control of viral infectivity by tripartite motif proteins.** *Hum Gene Ther* 2005, **16**:1125-1132.
3. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J: **The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys.** *Nature* 2004, **427**:848-853.
4. Li X, Li Y, Stremlau M, Yuan W, Song B, Perron M, Sodroski J: **Functional replacement of the RING, B-box 2, and coiled-coil domains of tripartite motif 5alpha (TRIM5alpha) by heterologous TRIM domains.** *J Virol* 2006, **80**:6198-6206.
5. Li Y, Li X, Stremlau M, Lee M, Sodroski J: **Removal of arginine 332 allows human TRIM5alpha to bind human immunodeficiency virus capsids and to restrict infection.** *J Virol* 2006, **80**:6738-6744.
6. Stremlau M, Perron M, Welikala S, Sodroski J: **Species-specific variation in the B30.2(SPRY) domain of TRIM5alpha determines the potency of human immunodeficiency virus restriction.** *J Virol* 2005, **79**:3139-3145.
7. Nakayama EE, Miyoshi H, Nagai Y, Shioda T: **A specific region of 37 amino acid residues in the SPRY (B30.2) domain of African green monkey TRIM5alpha determines species-specific restriction of simian immunodeficiency virus SIVmac infection.** *J Virol* 2005, **79**:8870-8877.
8. Perez-Caballero D, Hatzioannou T, Yang A, Cowan S, Bieniasz PD: **Human tripartite motif 5alpha domains responsible for retrovirus restriction activity and specificity.** *J Virol* 2005, **79**:8969-8978.

9. Ohkura S, Yap MW, Sheldon T, Stoye JP: **All three variable regions of the TRIM5alpha B30.2 domain can contribute to the specificity of retrovirus restriction.** *J Virol* 2006, **80**:8554-8565.
10. Cowan S, Hatzioannou T, Cunningham T, Muesing MA, Gottlinger HG, Bieniasz PD: **Cellular inhibitors with Fv1-like activity restrict human and simian immunodeficiency virus tropism.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:11914-11919.
11. Ikeda Y, Ylinen LM, Kahar-Bador M, Towers GJ: **Influence of gag on human immunodeficiency virus type 1 species-specific tropism.** *J Virol* 2004, **78**:11816-11822.
12. Owens CM, Yang PC, Gottlinger H, Sodroski J: **Human and simian immunodeficiency virus capsid proteins are major viral determinants of early, postentry replication blocks in simian cells.** *J Virol* 2003, **77**:726-731.
13. Sebastian S, Luban J: **TRIM5alpha selectively binds a restriction-sensitive retroviral capsid.** *Retrovirology* 2005, **2**:40.
14. Stremlau M, Perron M, Lee M, Li Y, Song B, Javanbakht H, Diaz-Griffero F, Anderson DJ, Sundquist WI, Sodroski J: **Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:5514-5519.
15. Mische CC, Javanbakht H, Song B, Diaz-Griffero F, Stremlau M, Strack B, Si Z, Sodroski J: **Retroviral restriction factor TRIM5alpha is a trimer.** *J Virol* 2005, **79**:14446-14450.
16. Berthoux L, Sebastian S, Sayah DM, Luban J: **Disruption of human TRIM5alpha antiviral activity by nonhuman primate orthologues.** *J Virol* 2005, **79**:7883-7888.

17. Javanbakht H, Yuan W, Yeung DF, Song B, Diaz-Griffero F, Li Y, Li X, Stremlau M, Sodroski J: **Characterization of TRIM5alpha trimerization and its contribution to human immunodeficiency virus capsid binding.** *Virology* 2006, **353**:234-246.
18. Forshey BM, Shi J, Aiken C: **Structural requirements for recognition of the human immunodeficiency virus type 1 core during host restriction in owl monkey cells.** *J Virol* 2005, **79**:869-875.
19. Shi J, Aiken C: **Saturation of TRIM5 alpha-mediated restriction of HIV-1 infection depends on the stability of the incoming viral capsid.** *Virology* 2006, **350**:493-500.
20. Perron MJ, Stremlau M, Lee M, Javanbakht H, Song B, Sodroski J: **The human TRIM5alpha restriction factor mediates accelerated uncoating of the N-tropic murine leukemia virus capsid.** *J Virol* 2007, **81**:2138-2148.
21. Anderson JL, Campbell EM, Wu X, Vandegraaff N, Engelman A, Hope TJ: **Proteasome inhibition reveals that a functional preintegration complex intermediate can be generated during restriction by diverse TRIM5 proteins.** *J Virol* 2006, **80**:9754-9760.
22. Wu X, Anderson JL, Campbell EM, Joseph AM, Hope TJ: **Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5alpha restriction of HIV-1 reverse transcription and infection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:7465-7470.
23. Chatterji U, Bobardt MD, Gaskill P, Sheeter D, Fox H, Gallay PA: **Trim5alpha accelerates degradation of cytosolic capsid associated with productive HIV-1 entry.** *J Biol Chem* 2006, **281**:37025-37033.
24. Ylinen LM, Keckesova Z, Wilson SJ, Ranasinghe S, Towers GJ: **Differential restriction of human immunodeficiency virus type 2 and**

- simian immunodeficiency virus SIVmac by TRIM5alpha alleles. *J Virol* 2005, **79**:11580-11587.
25. Sakuma R, Noser JA, Ohmine S, Ikeda Y: **Rhesus monkey TRIM5alpha restricts HIV-1 production through rapid degradation of viral Gag polyproteins.** *Nature medicine* 2007, **13**(5):631-635.
 26. Nisole S, Lynch C, Stoye JP, Yap MW: **A Trim5-cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:13324-13328.
 27. Sayah DM, Sokolskaja E, Berthoux L, Luban J: **Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1.** *Nature* 2004, **430**:569-573.
 28. Diaz-Griffero F, Vandegraaff N, Li Y, McGee-Estrada K, Stremlau M, Welikala S, Si Z, Engelman A, Sodroski J: **Requirements for capsid-binding and an effector function in TRIMCyp-mediated restriction of HIV-1.** *Virology* 2006, **351**:404-419.
 29. Zhang F, Hatzioannou T, Perez-Caballero D, Derse D, Bieniasz PD: **Antiretroviral potential of human tripartite motif-5 and related proteins.** *Virology* 2006, **353**:396-409.
 30. Lin TY, Emerman M: **Cyclophilin A interacts with diverse lentiviral capsids.** *Retrovirology* 2006, **3**:70
 31. Luban J, Bossolt KL, Franke EK, Kalpana GV, Goff SP: **Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B.** *Cell* 1993, **73**:1067-1078.
 32. Towers GJ, Hatzioannou T, Cowan S, Goff SP, Luban J, Bieniasz PD: **Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors.** *Nat Med* 2003, **9**:1138-1143.

33. Yap MW, Dodding MP, Stoye JP: **Trim-cyclophilin A fusion proteins can restrict human immunodeficiency virus type 1 infection at two distinct phases in the viral life cycle.** *J Virol* 2006, **80**:4061-4067.
34. Berthoux L, Sebastian S, Sokolskaja E, Luban J: **Cyclophilin A is required for TRIM5 α -mediated resistance to HIV-1 in Old World monkey cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005:In Press.
35. Keckesova Z, Ylinen LM, Towers GJ: **Cyclophilin A renders human immunodeficiency virus type 1 sensitive to Old World monkey but not human TRIM5 alpha antiviral activity.** *J Virol* 2006, **80**:4683-4690.
36. Bosco DA, Eisenmesser EZ, Pochapsky S, Sundquist WI, Kern D: **Catalysis of cis/trans isomerization in native HIV-1 capsid by human cyclophilin A.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:5247-5252.
37. Stremlau M, Song B, Javanbakht H, Perron M, Sodroski J: **Cyclophilin A: an auxiliary but not necessary cofactor for TRIM5alpha restriction of HIV-1.** *Virology* 2006, **351**:112-120.
38. Saenz DT, Teo W, Olsen JC, Poeschla EM: **Restriction of feline immunodeficiency virus by Ref1, Lv1, and primate TRIM5alpha proteins.** *J Virol* 2005, **79**:15175-15188.
39. Sebastian S, Sokolskaja E, Luban J: **Arsenic counteracts human immunodeficiency virus type 1 restriction by various TRIM5 orthologues in a cell type-dependent manner.** *J Virol* 2006, **80**:2051-2054.
40. Lilly F: **Susceptibility to two strains of Friend leukemia virus in mice.** *Science* (New York, NY 1967, **155**(761):461-462
41. Best S, Le Tissier P, Towers G, Stoye JP: **Positional cloning of the mouse retrovirus restriction gene Fv1.** *Nature* 1996, **382**(6594):826-829.

42. Towers G, Bock M, Martin S, Takeuchi Y, Stoye JP, Danos O: **A conserved mechanism of retrovirus restriction in mammals.** *Proceeding of the National Academy of Sciences of United States of America* 2000, **97(22)**:12295-12299.
43. Passerini LD, Keckesova Z, Towers GJ: **Retroviral restriction factor Fv1 and TRIM5alpha act independently and can compete for incoming virus before reverse transcription.** *Journal of Virology* 2006, **80(5)**:2100-2105.
44. Berthoux L, Towers GJ, Gurer C, Salomoni P, Pandolfi PP, Luban J: **As(2)O(3) enhances retroviral reverse transcription and counteracts Ref1 antiviral activity.** *J Virol* 2003, **77**:3167-3180.
45. Bock M, Bishop KN, Towers G, Stoye JP: **Use of a transient assay for studying the genetic determinants of Fv1 restriction.** *J Virol* 2000, **74**:7422-7430.
46. Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhbass U, Montagnier L, Charneau P: **HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap.** *Cell* 2000, **101**:173-185.
47. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D: **Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo.** *Nat Biotechnol* 1997, **15**:871-875.
48. Naviaux RK, Costanzi E, Haas M, Verma IM: **The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses.** *J Virol* 1996, **70**:5701-5705.
49. Neil S, Martin F, Ikeda Y, Collins M: **Postentry restriction to human immunodeficiency virus-based vector transduction in human monocytes.** *J Virol* 2001, **75**:5448-5456.

Figure legends

Figure 1: Expression and subcellular distribution. **A**, FLAG-tagged TRIM5 α (rhesus, human, or African green monkey orthologues) and TRIMCyp were stably expressed in MDTF and in D17 cells, and expression was assessed by western blotting with antibodies directed against FLAG (top) or actin (bottom). The percentage of transduced cells was roughly similar for all cell lines created, as judged by the percentage of puromycin-resistant cells (not shown). The presence of the FLAG tag in TRIM5 α_{hu} was confirmed by sequencing of the plasmid DNA. **B**, MDTF or D17 cells expressing TRIM5 α_{rh} or TRIMCyp were fixed and stained using an antibody against FLAG and counterstained with Hoechst 33342 to reveal DNA.

Figure 2: Restriction of N-MLV. **A**, MDTF or D17 cells expressing TRIM5 α_{hu} , TRIM5 α_{AGM} , or control cells were infected with multiple dilutions of N-MLV and B-MLV vectors expressing GFP. The percentage of infected cells was determined by flow cytometry. **B**, MDTF or D17 cells expressing various orthologues of TRIM5 α , or expressing TRIMCyp, were infected with GFP-expressing N-MLV or B-MLV vectors. The virus dose was adjusted so that 5% to 10% of the control cells were infected. The percentage of infected cells was determined 2 days later by flow cytometry, and results are shown as % of the values obtained for the control cells. The experiment was carried out in triplicates, and standard deviations are shown.

Figure 3: Restriction of HIV-1. **A**, MDTF or D17 cells expressing TRIM5 α_{rh} , TRIMCyp, or control cells were infected with multiple dilutions of HIV-1_{GFP}, an HIV-1 vector expressing GFP. The percentage of infected cells was determined by flow cytometry. **B**, MDTF, HeLa or D17 cells expressing TRIM5 α_{rh} or TRIMCyp, and control cells were infected with HIV-1_{GFP}. The virus dose was

adjusted so that 5% to 10% of control cells were infected. The percentage of infected cells was determined 2 days later by flow cytometry, and results are shown as % of the values obtained for the control cells. The experiment was carried out in triplicates, and standard deviations are shown.

Figure 4: Enhancement of HIV-1 infection in cells expressing TRIMCyp by cyclosporine. **A**, MDTF or D17 cells, expressing TRIMCyp or not (control cells), were infected with HIV-1_{GFP}. The virus dose was adjusted so that 1% to 3% of cells would be infected in the absence of cyclosporine for each cell line, and the infections were done in the presence of various cyclosporine concentrations. The percentage of infected cells was determined 2 days later by flow cytometry. **B**, as above, except that CsA concentration was constant (6 μ M) and cells were infected with multiple doses of HIV-1_{GFP}.

Figure 5: Fate-of-capsid assay. MDTF or D17 cells expressing TRIM5 α_{rh} or TRIMCyp and control cells were infected with HIV-1 VLPs for 4 hours, then the cells were allowed to grow for 2 more hours in a virus-free medium. Following the infection, cells were submitted to hypotonic lysis and the protein suspension was sedimented through a 50% sucrose gradient. HIV-1 CA was detected by western blotting of whole lysates, post-sedimentation pellets and supernatants (materials that did not enter the sucrose cushion). The mature CA (24 kDa) band was quantitated for the blot showing the pellet fractions and quantitation data are shown expressed as relative values.

Figure 6: Fate-of-capsid assay in the presence of cyclosporine. MDTF and D17 cells expressing TRIMCyp, and control cells were infected with HIV-1 VLPs as in Fig. 5. The cells expressing TRIMCyp were infected in the presence or not

of cyclosporine (5 μ M). CA was detected in post-sedimentation pellets and supernatants. Pellet CA was quantitated as in Fig. 5.

Figure 7: Retroviral cDNA synthesis. MDTF or D17 cells expressing the indicated TRIM5 orthologues were infected for 12 hours with HIV-1_{GFP} at a MOI yielding about 20% infected cells for the control cells. In addition, infection of cells expressing TRIMCyp was carried out in the presence or absence of 5 μ M cyclosporine, and infection of control cells was done in the presence or absence of the reverse transcriptase inhibitor nevirapine (80 μ M). Top panel, total cellular DNAs were extracted and an aliquot of each DNA sample was subjected to a 30-cycle PCR amplification using ODNs annealing to GFP sequences. PCR products were separated on an agarose gel and revealed with ethidium bromide. Bottom panel, as above but HIV-1_{GFP}-specific DNAs were quantitated by real-time PCR, using dilutions of a plasmid containing the GFP sequence as a standard.

Figure 8: Restriction by Fv1. MDTF or D17 cells, expressing Fv1^b or not (control cells), were infected with multiple dilutions of N-MLV and B-MLV vectors expressing GFP. The percentage of infected cells was determined by flow cytometry 2 days later.

Figures

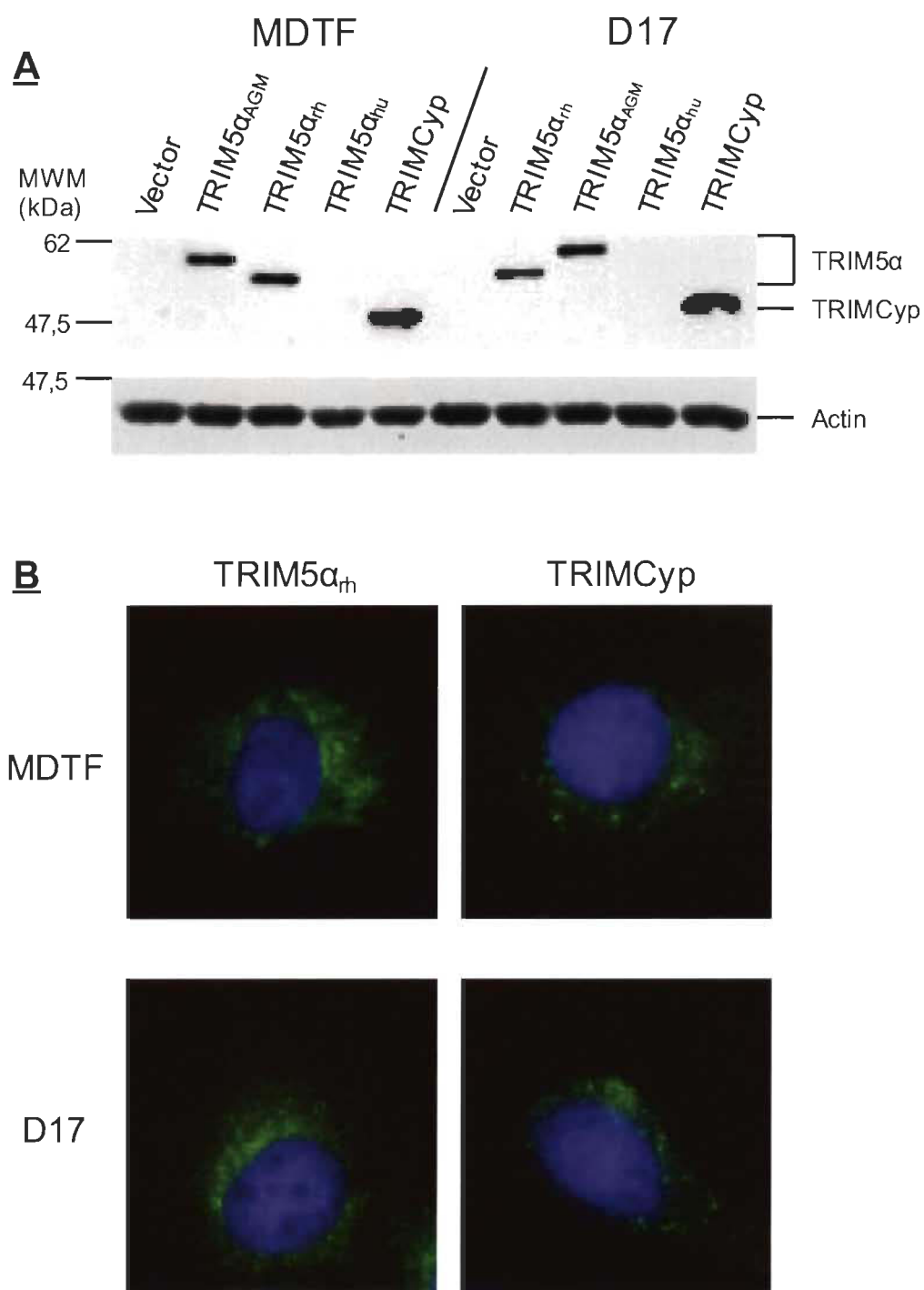


Figure 1

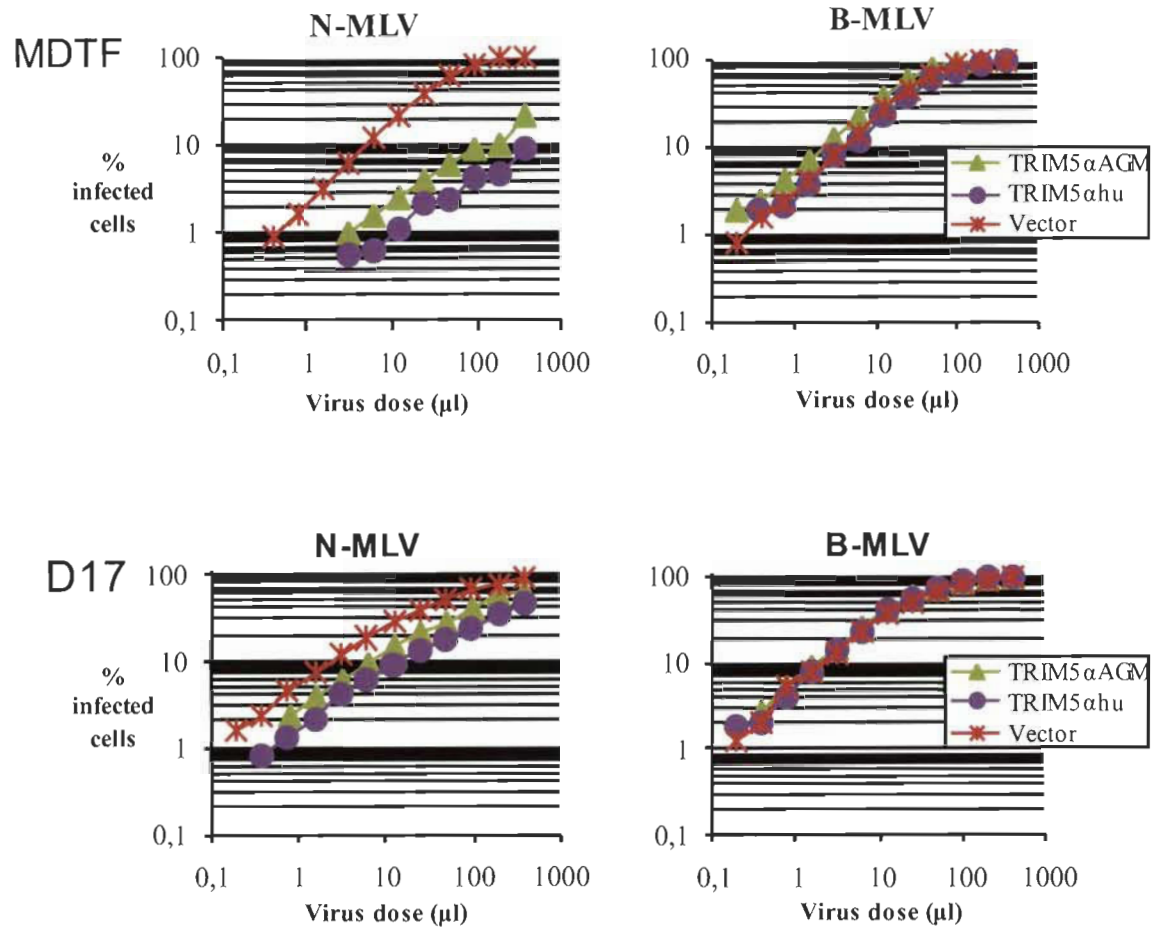
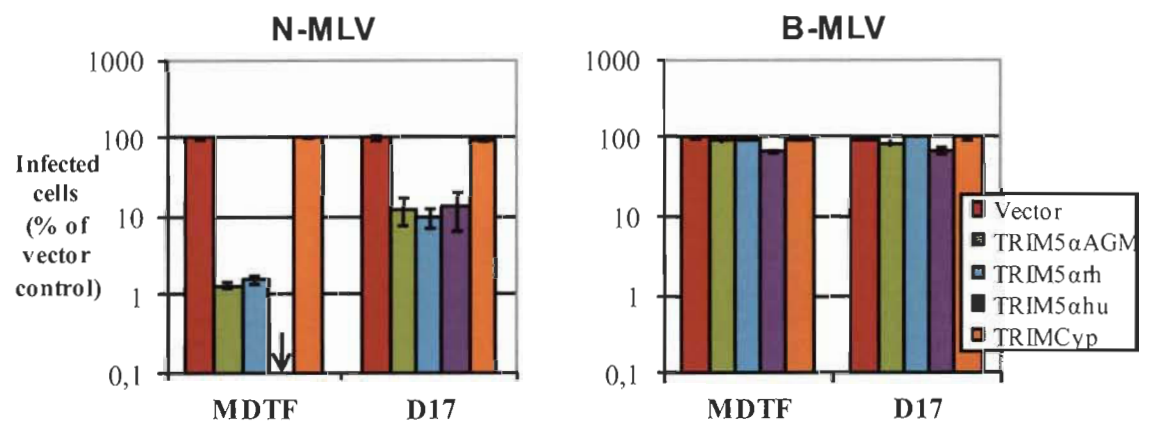
A**B**

Figure 2

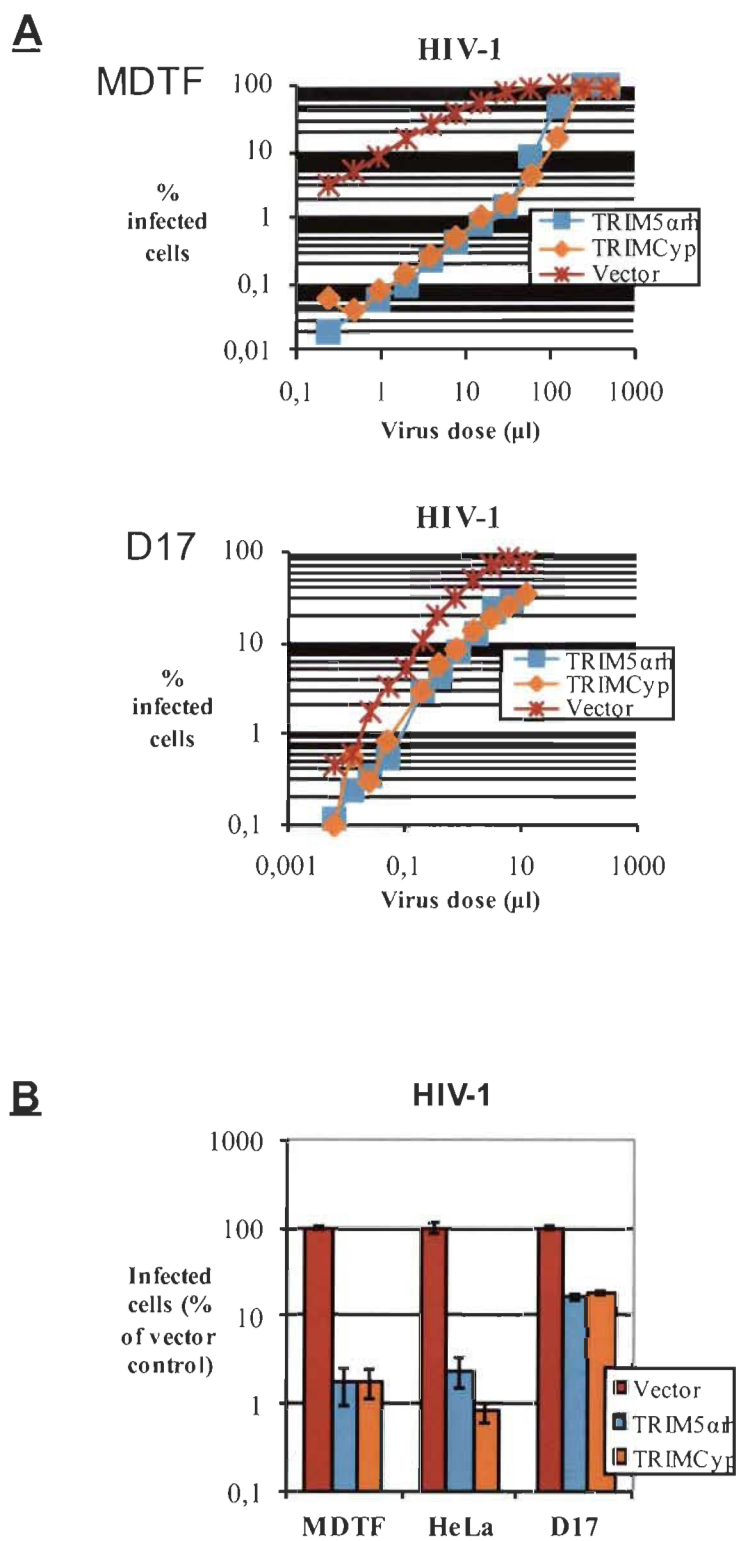


Figure 3

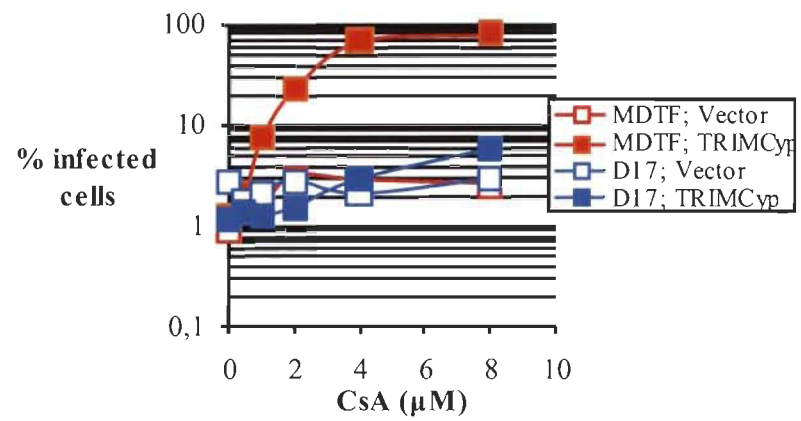
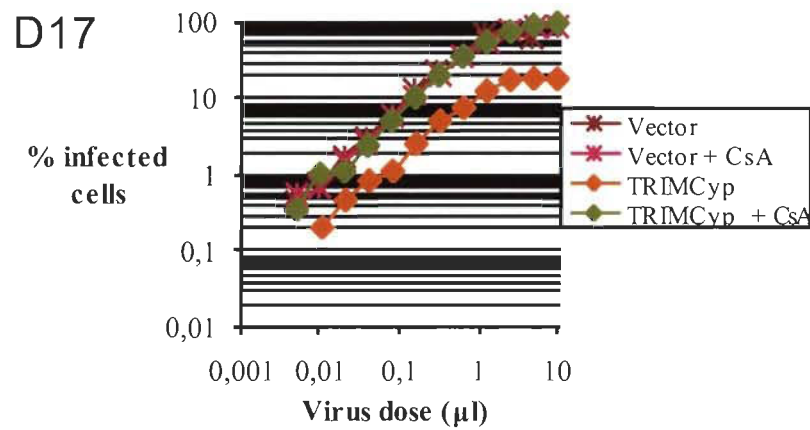
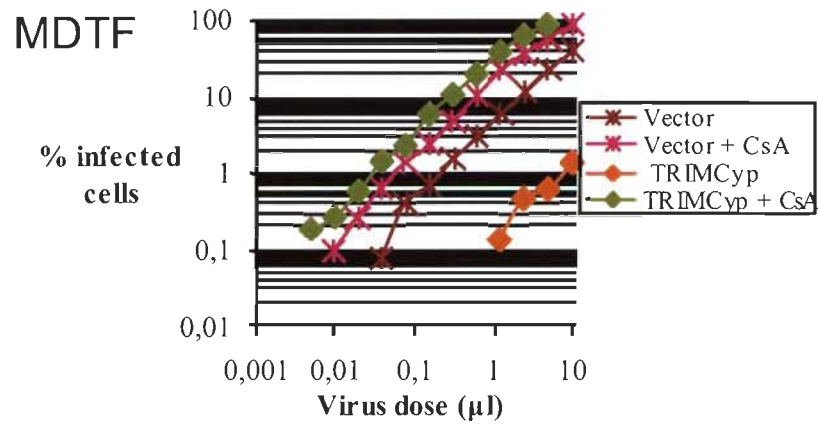
A**B**

Figure 4

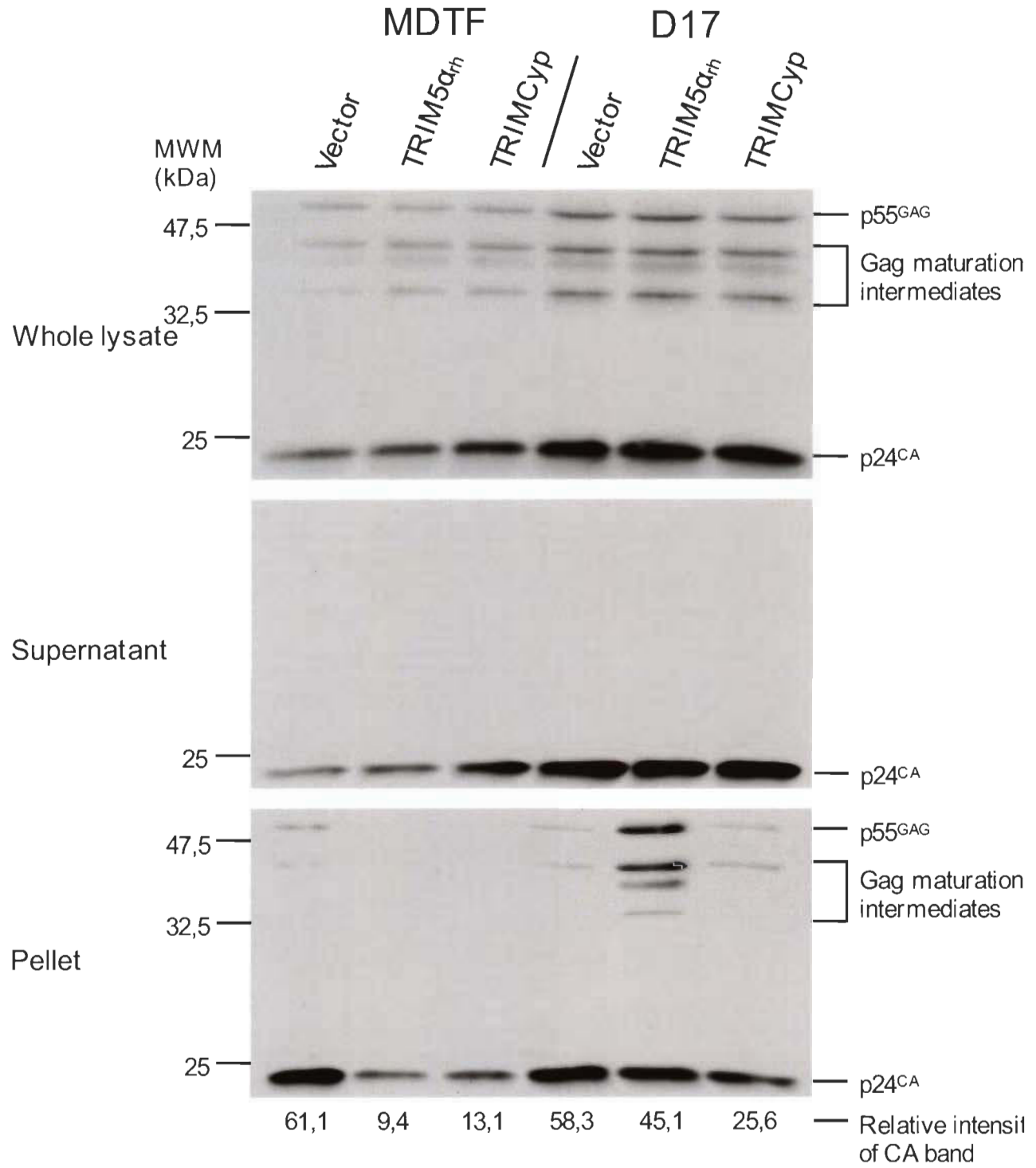


Figure 5

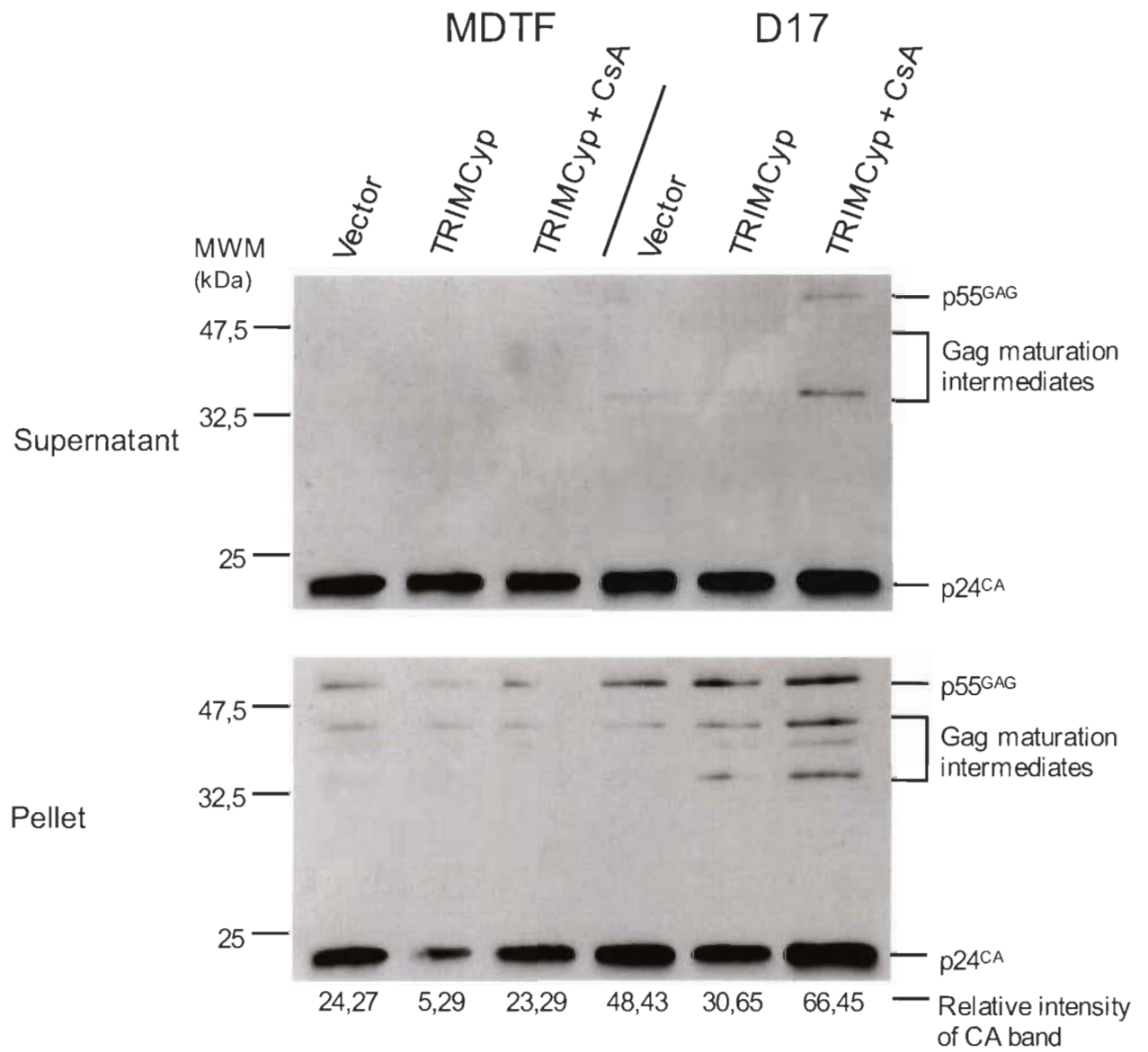


Figure 6

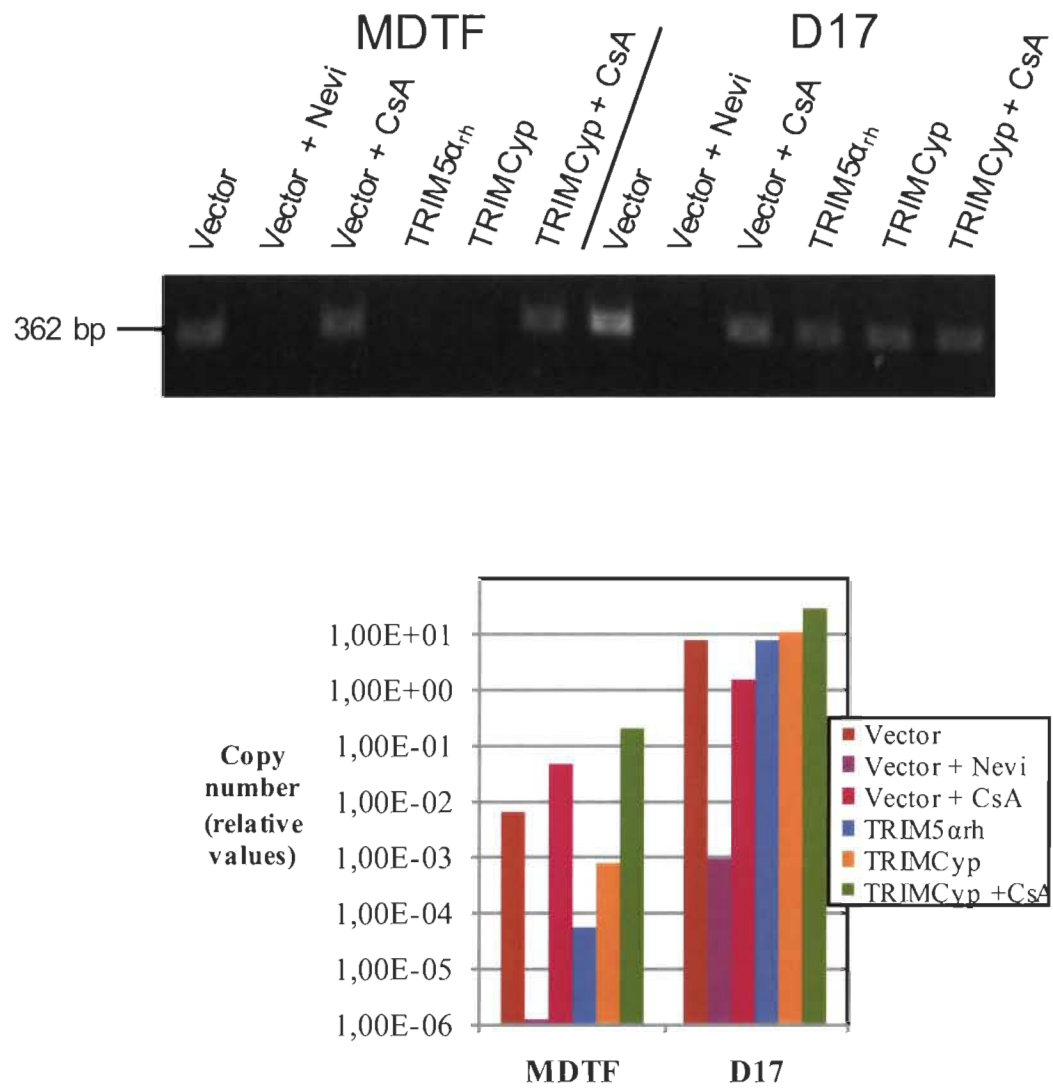


Figure 7

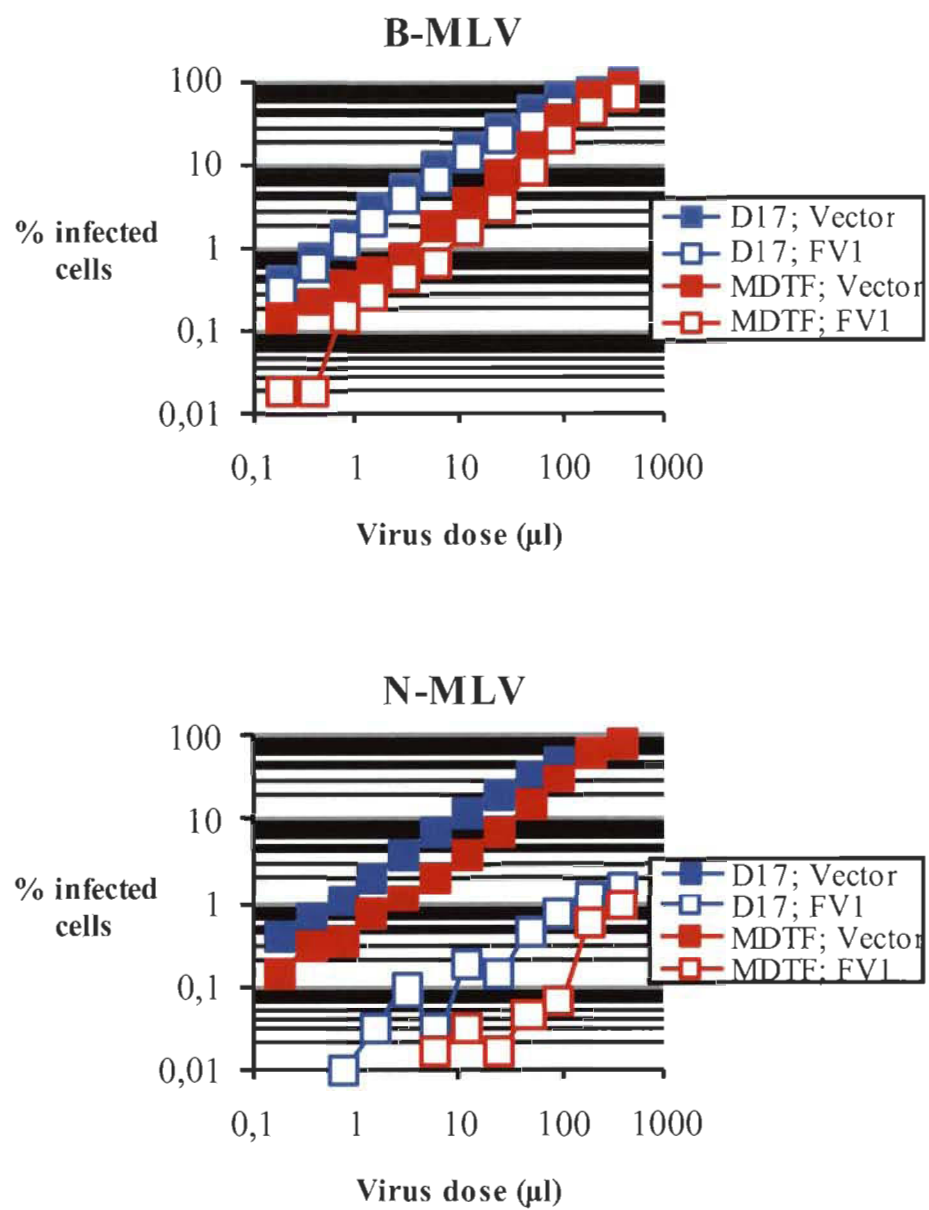


Figure 8

2.5 Conclusions

Une étude menée sur TRIM5 α exprimé dans les cellules canines D17 a montré que TRIM5 α rh perd de son activité de restriction contre le VIH-1 alors que TRIM5 α hu perd de son activité de restriction contre le virus FIV (Saenz et al., 2005).

Les expériences réalisées lors de cette étude ont permis d'étudier le phénotype de restriction de TRIM5 α dans les cellules D17. L'activité de restriction des différents allèles de TRIM5 α est diminuée dans ces cellules. Cette perte d'activité de restriction n'est pas due à la localisation ni au niveau d'expression de la protéine TRIM5 α . L'interaction avec le virus est, quant à elle, affectée dans les cellules D17 car l'accélération de la décapsidation ainsi que l'inhibition de la synthèse d'ADN_C sont diminués dans ces cellules.

Ces résultats révèlent que l'environnement fourni par les cellules D17 est inadéquat à la restriction par TRIM5 α /TRIMCyp. Ceci suggère que (1) un facteur nécessaire à la restriction par TRIM5 α /TRIMCyp est manquant dans les cellules D17 ou (2) un facteur présent dans les cellules D17 inhibe TRIM5 α /TRIMCyp. La création d'hétérocaryons, c'est-à-dire la réunion dans un même cytoplasme de noyaux d'origine différente, de cellules MDTK et D17 permettrait de distinguer l'hypothèse qui s'applique aux cellules D17. En effet, s'il s'avère qu'il y a un facteur manquant dans les cellules D17 mais présent dans les cellules MDTF, les hétérocaryons montreront une activité de restriction. Par contre, si les cellules D17 possèdent un facteur inhibant l'activité de TRIM5 α /TRIMCyp, les hétérocaryons présenteront aucune ou peu d'activité de restriction (figure 2.5).

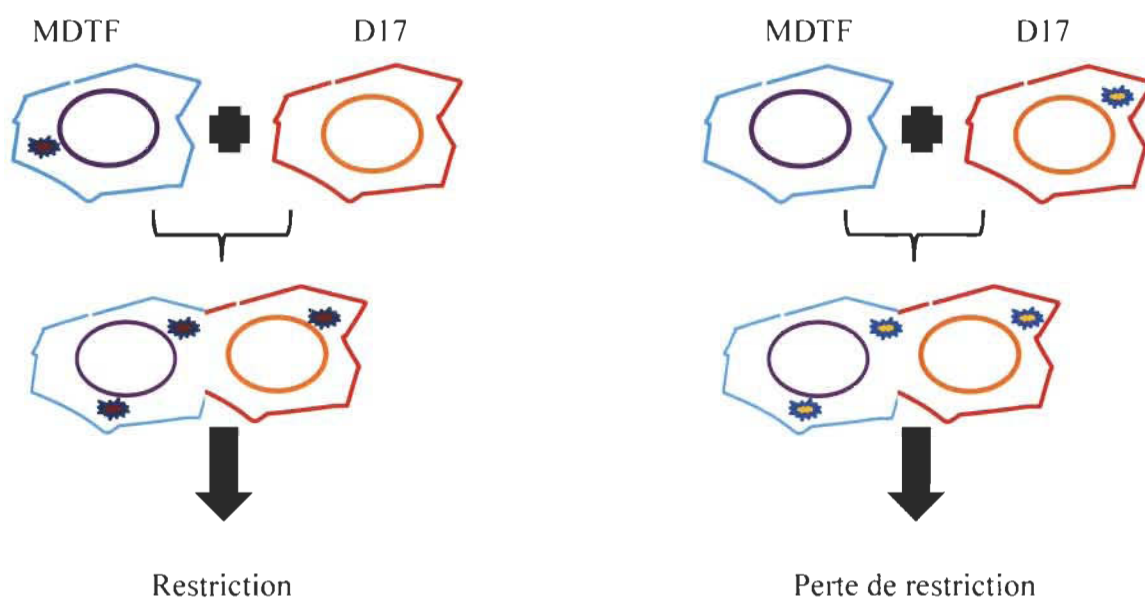


Figure 2.5: Production d'hétérocaryons de cellules MDTF et D17. À gauche un facteur est absent dans les cellules D17 mais présent dans les cellules MDTF permet la restriction par TRIM5 α . À droite, un facteur présent dans les cellules D17 mais absent dans les cellules MDTF empêche l'activité de restriction par TRIM5 α .

Par la suite, si l'hypothèse d'un possible facteur manquant dans les cellules D17 est retenue, la stratégie qui sera employée pour l'identifier utilisera une banque d'ADN_C. Cette banque sera produite à partir de cellules humaines puisqu'elles possèdent un TRIM5 α _{hu} capable d'inhiber le virus MLV-N. La banque d'ADN_C sera introduite dans un vecteur rétroviral puis transduite dans les cellules D17 exprimant un TRIM5 α _{hu}. Les cellules D17 exprimant un TRIM5 α _{hu} ainsi qu'un ADN_C seront infectées par une grande quantité de virus MLV-N exprimant GFP de façon à obtenir moins de 1% de cellules infectées. Finalement, les cellules résistantes aux virus MLV-N donc GFP négatives seront isolées puis l'ADN_C qu'elles contiennent sera caractérisé (Figure 2.6).

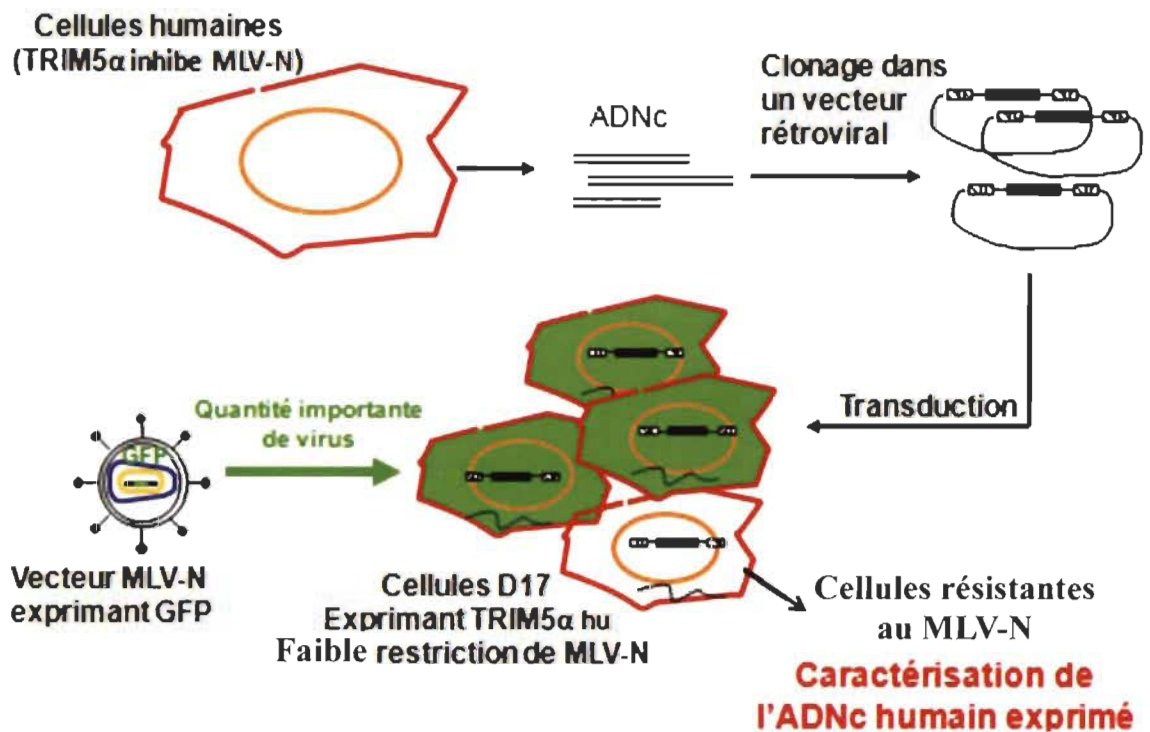


Figure 2.6 : Possible stratégie de clonage d'un facteur manquant dans les cellules D17. Une banque d'ADNC sera clonée dans un vecteur rétroviral puis introduite dans les cellules D17 possédant un TRIM5 α hu. Les cellules seront ensuite infectées avec le virus MLV-N GFP puis l'ADNC des cellules résistantes sera étudié.

CHAPITRE 3

ÉTUDE DE L'IMPLICATION DE MULTIMÈRES DE TRIM5 α VIA LES CORPS CYTOPLASMIQUES DANS LA SÉQUESTRATION VIRALE

3.1 Problématique

Comme mentionné précédemment, TRIM5 α et TRIMCyp inhibent la réplication rétrovirale par plusieurs mécanismes : accélération de la décapsidation, inhibition du transport nucléaire et dégradation par le protéasome. Pour ce faire, une interaction directe entre TRIM5 α et la capsid du virus est nécessaire (Sebastian et al., 2005). La capsid rétrovirale est constituée de centaines de protéines qui s'associent pour former des hexamères (Ganser-Pomillos et al. 2007)(Figure 1.4). La restriction par TRIM5 α implique une interaction avec une capsid virale mature puisque des protéines de capsid libres n'interagissent pas avec TRIM5 α (Sebastian et al., 2005). Suite à un traitement au MG132, le virus est localisé dans les corps cytoplasmiques de TRIM5 α . Donc, TRIM5 α séquestre le virus dans les corps cytoplasmiques (Campbell et al., 2008). Il n'a cependant pas été démontré que cette séquestration est requise pour la restriction. La présence de corps cytoplasmiques nous amène donc à penser que TRIM5 α doit lui aussi être présent sous forme de multimères. Bien que l'utilisation d'agents formant des liaisons croisées entre les protéines proches a montré que TRIM5 α est un trimère et que parfois des multimères de haut poids moléculaire ont été observés (Mische et al., 2005, Javanbakht et al., 2006, Li et al., 2008) ceci ne parvient pas à expliquer la présence de corps cytoplasmiques. La multimérisation de TRIM5 α et de TRIMCyp est probablement importante pour leur activité de restriction. Nos objectifs sont d'étudier la multimérisation de TRIM5 α et de TRIMCyp pour la formation des corps cytoplasmiques ainsi que la séquestration du VIH-1 dans ces structures.

3.2 Méthode

3.2.1 Multimérisation de TRIM5 α

Trois pétris de cellules confluentes soit les MDTF TRIM5 α ou TRIMCyp ont été lysées à l'aide d'une solution de Nonidet P40 (0,5%, dans du PBS) pendant 15 minutes dans la glace. Les lysats ont ensuite été centrifugés à 14000xg pendant 15 minutes à 4° C (ne pas congeler). La portion soluble de chaque lysat a été divisée en aliquots. Puis la liaison croisée a été faite grâce à l'ajout de glutaraldéhyde (0, 0.25, 0.5, 1.25 et 2.5mM) pendant 5 minutes à la température de la pièce. Ensuite, la réaction est arrêtée avec une solution de Tris-HCl pH 7,5 à 0,1M pour une concentration finale de 0,01M. Les protéines ont été dénaturées par ébullition en présence de SDS.. Finalement, la multimérisation est analysée par western blot. La séparation des protéines s'effectue sur gel de polyacrylamide (gel de compression à 4% et gel de résolution à 8%). Lors du transfert sur membrane de nitrocellulose, le gel de compression est conservé. L'anticorps primaire utilisé est un anticorps dirigé contre l'épitope FLAG (anticorps monoclonal de lapin, Cell Signaling Technology).

3.2.2 Microscopie à immunofluorescence

Les cellules sont mises en plaque sur lamelle. À confluence d'environ 60%, elles sont fixées avec du formaldéhyde 4% (dilué dans du DMEM) et incubées 10 minutes à une température de 37°C. Suite à trois lavages au PBS, elles sont incubées sur glace une à deux minutes avec la solution de perméabilisation (Triton X-100 0,1% et citrate de sodium 0,1mM, dilués dans l'eau) et lavées deux fois avec du PBS. Les cellules sont incubées dans une solution de blocage (SVF 10% dilué dans du PBS) 30 minutes à la température de la pièce puis incubées 4 heures avec une solution d'anticorps primaire (anti-FLAG de lapin, anti-capside de souris et SVF 10% dilué dans du PBS). Suite à 5

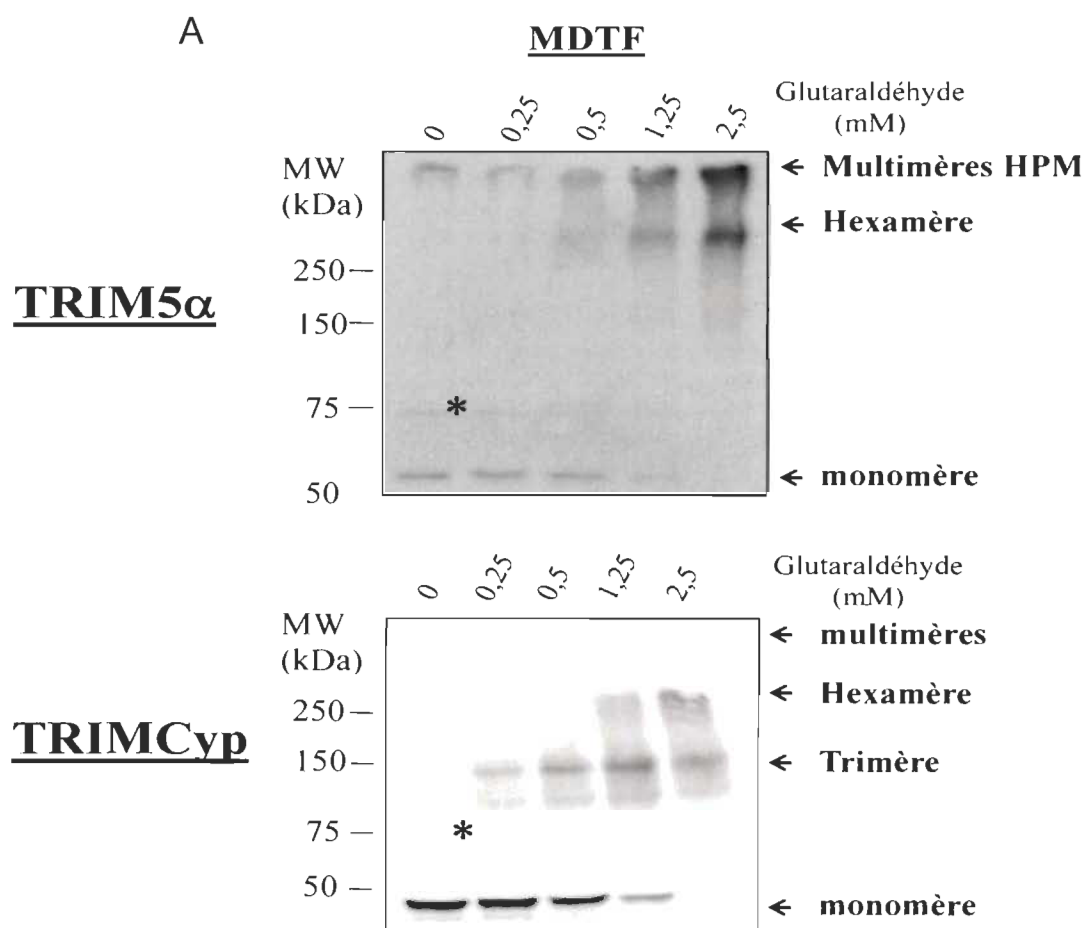
lavages, les cellules sont incubées dans le noir avec une solution d'anticorps secondaires fluorescents (Alexa-594 conjugué à l'anticorps anti-lapin, Alexa-488 conjugué à l'anticorps anti-souris et SVF 10% dilué dans du PBS) pendant 1 heure. Tous les anticorps sont utilisés à une dilution de 1/200. Avant d'être placées sur lames avec du Vectashield (Vector Laboratories), les lamelles sont lavées 5 fois avec du PBS dont le quatrième lavage est une solution de Hoechst 33342 (0,8µg/mL, Molecular Probes) permettant la coloration des noyaux. Les photos ont été générées avec le microscope ZEISS Axio Observer A1 et analysées avec le logiciel AxioVision Release 4.7.2.

3.3 Résultats

3.3.1 Multimérisation de TRIM5α et de TRIMCyp

Dans l'étude de la multimérisation de TRIM5α et de TRIMCyp, les cellules MDTF exprimant TRIM5α et TRIMCyp ont été traitées avec une concentration croissante de glutaraldéhyde. TRIM5α présente, des bandes pour les formes monomériques (55-60 kDa), d'autres dont la taille semble correspondre à des hexamères (300-400 kDa) ainsi que des bandes de haut poids moléculaire. Ces bandes se trouvent dans le gel de compression et pénètrent à peine le gel. Pour TRIMCyp, en plus de la forme monomérique (environ 45 kDa), des multimères correspondant aux hexamères ainsi que des multimères de haut poids moléculaire, les formes dimériques et trimériques sont aussi présentes. Des concentrations plus élevées de glutaraldéhyde sont requises pour révéler la présence d'hexamères et de multimères de haut poids moléculaire (Figure 3.1A). Il semble donc que TRIM5α et TRIMCyp ont des patrons de multimérisation différents. Puisque le domaine coiled-coil peut se dimériser par la formation de liens disulfures covalents entre les résidues cystéines, un western blot de TRIM5α et TRIMCyp dans des conditions réductrices et non-réductrices a été effectué. L'agent réducteur utilisé est le β-mercaptoéthanol. En absence de β-mercaptoéthanol, TRIM5α et TRIMCyp migrent au poids attendu et sont moins détectables. De plus, TRIM5α et

TRIMCyp ne présentent pas de formes multimériques (Figure 3.1B). Donc, il semble que les ponts disulfures ne soient pas impliqués dans la multimérisation de TRIM5 α et TRIMCyp.



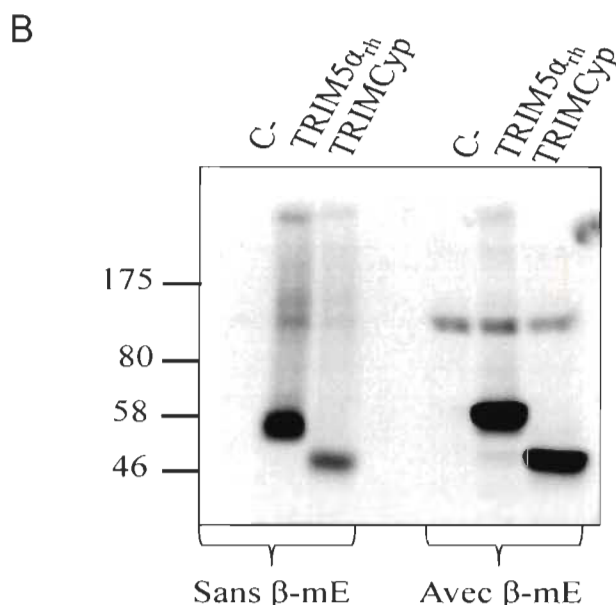


FIGURE 3.1 : Multimérisation de TRIM5 α et TRIMCyp. (A) Cellules MDTF exprimant TRIM5 α et TRIMCyp traitées avec une concentration croissante de glutaraldéhyde. Le patron de multimérisation est indiqué à la droite. (B) Cellule HeLa exprimant TRIM5 α et TRIMCyp en présence ou en absence de 100 μ M de β -mercaptoéthanol.

Afin d'étudier la possibilité que l'infection virale puisse moduler ou induire la multimérisation de TRIMCyp, les cellules MDTF exprimant TRIMCyp ont été infectées par le virus VIH-1 GFP pendant 6 heures puis traitées au glutaraldéhyde comme précédemment. Approximativement 1% des cellules MDTF TRIMCyp sont infectées comparativement à plus de 50% pour les cellules MDTF. TRIMCyp est donc soumis à une grande quantité de virus favorisant les interactions TRIMCyp : capside. L'infection des cellules MDTF exprimant TRIMCyp n'influence pas la quantité de trimères, d'hexamères et de complexes de haut poids moléculaire (Figure 3.2). L'expérience a été répétée en présence de CsA, empêchant ainsi la liaison de TRIMCyp à la capside virale. L'ajout de CsA n'affecte pas le patron de multimérisation de TRIMCyp (induite artificiellement par la glutaraldéhyde) (Figure 3.2). Ces résultats impliquent donc que la multimérisation de TRIMCyp n'est pas dépendante de l'infection virale.

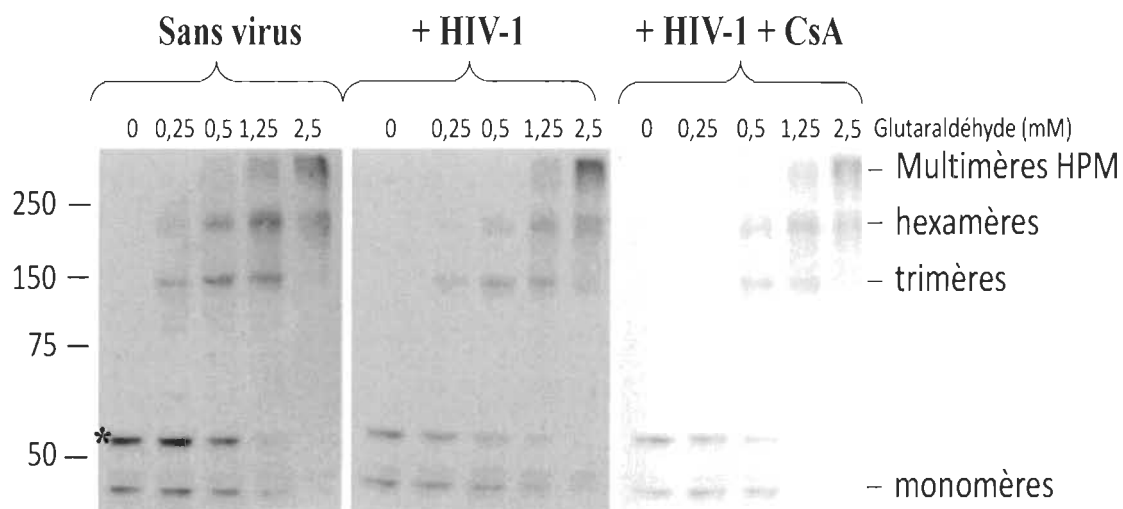


FIGURE 3.2 : Multimérisation de TRIMCyp lorsque les cellules MDTFTRIMCyp sont infectées par le VIH-1. Cellules MDTF exprimant TRIMCyp infectées pendant 6 heures avec le virus VIH-1 et en présence ou non de CsA (5 μ M) puis traitées avec une concentration croissante de glutaraldéhyde.

Il a été montré que les protéines TRIM5 α et TRIMCyp sont dégradées par le protéasome suite à l'infection virale (Rold et Aiken, 2008). Il est donc possible que l'infection virale module le patron de multimérisation de TRIM5 α et TRIMCyp avant que le complexe TRIM5 α : capsid soit dégradé par le protéasome. L'expérience a été reprise en ajoutant du MG132, puis le patron de multimérisation a été analysé. De plus, cette expérience a été réalisée en présence de 2 quantités de virus, l'une ayant une multiplicité d'infection d'environ 0,01 et l'autre de 0,2. La présence de MG132 ne change pas le profil de multimérisation de TRIMCyp puisqu'il y a toujours présence de monomères, dimères, trimères, hexamères et de complexes de hauts poids moléculaires (Figure 3.4). La bande correspondant aux hexamères est moins bien définie, ceci est probablement dû à des raisons techniques.

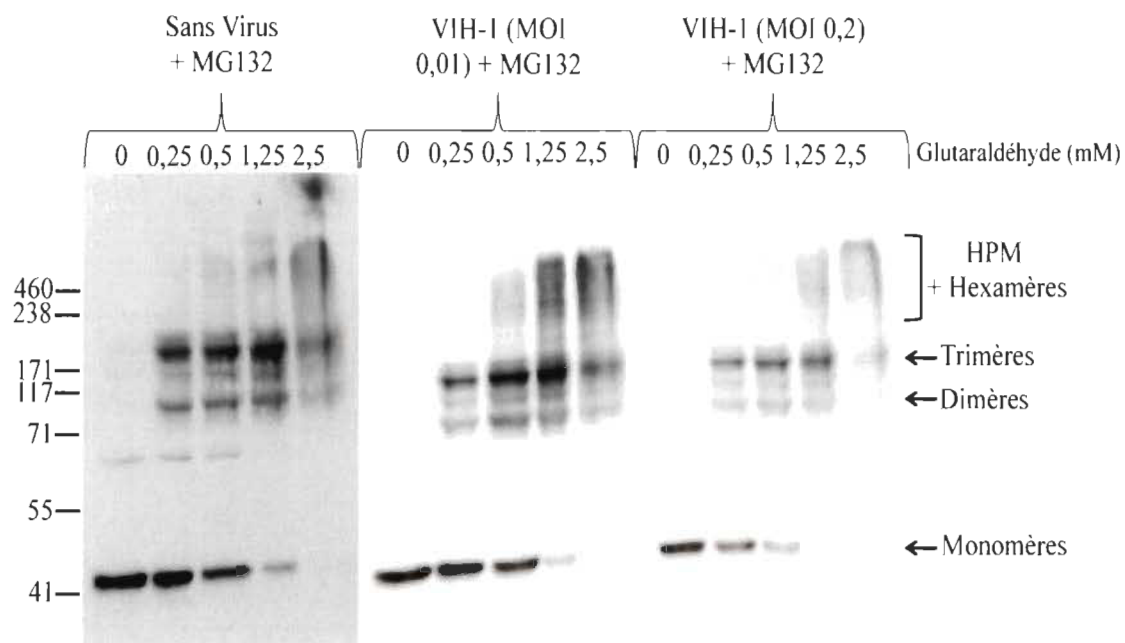


FIGURE 3.3 : Effet du MG132 sur le patron de multimérisation de TRIMCyp.
L'expérience a été faite avec des cellules MDTF exprimant TRIMCyp en présence de $1\mu\text{M}$ de MG132 et en utilisant 2 quantités de virus.

3.3.2 Séquestration dans les corps cytoplasmiques de TRIM5 α

Il est présumé mais non démontré que la séquestration du virus par TRIM5 α est requise dans l'activité de restriction de TRIM5 α . Pour mieux comprendre ce mécanisme de restriction, la microscopie à immunofluorescence a été utilisée dans l'analyse des cellules MDTF exprimant TRIMCyp traitées ou non au MG132 et infectées par le VIH-1 pendant 6 heures. En présence d'inhibiteur du protéasome, 3% de virus VIH-1 colocalisent avec TRIMCyp (sur un total de 3707 virus) alors que seulement 1% de virus VIH-1 colocalisent avec TRIMCyp (sur un total de 4793 virus) en absence de MG132 (Figure 3.4). Donc, le MG132 accroît le nombre d'événements de colocalisation. De plus, le MG132 augmente la taille des virus, probablement en empêchant leur dégradation.

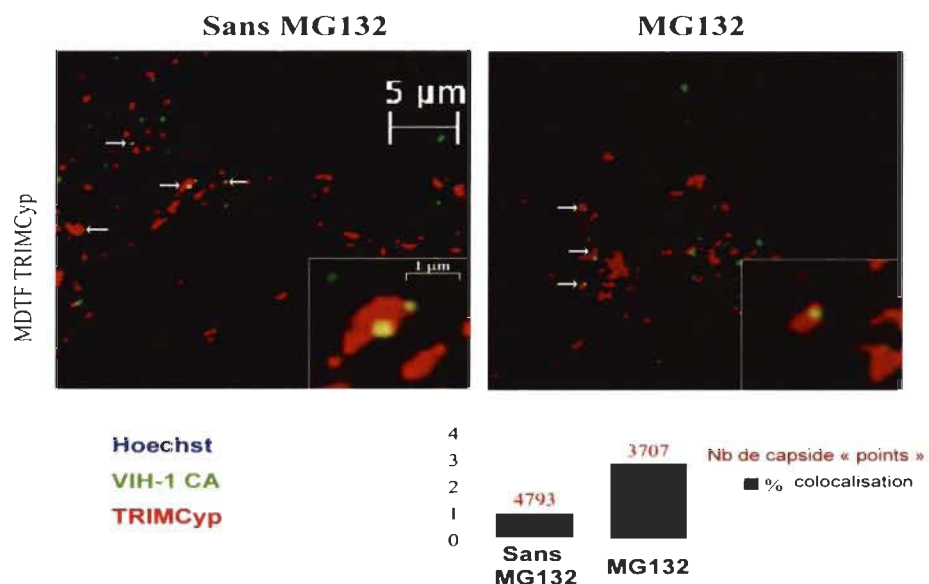


FIGURE 3.4 : Effet du MG132 sur la colocalisation du VIH-1 et de TRIMCyp. Cellule MDTF exprimant TRIMCyp en absence et en présence de MG132. Les noyaux des cellules sont représentés en bleu, la capside virale est indiquée en vert et TRIMCyp en rouge. Chaque point vert a été comptabilisé comme étant un virus. Les flèches montrent des exemples de colocalisation. Le graphique indique le pourcentage de colocalisation pour chacune des conditions ainsi qu'en rouge le nombre de capsides comptabilisés.

L'interaction entre TRIMCyp et le VIH-1 peut être inhibée par le traitement des cellules exprimant TRIMCyp à la CsA (se lie au site actif de CypA) ainsi que par une mutation H126Q dans la CypA (Dorfman et al., 1997). La mutation H126Q dans CypA correspond à la mutation H436Q dans TRIMCyp. En plus de prévenir l'interaction de CypA et de la capside virale, cette mutation réduit grandement l'activité peptidyl-prolyl isomerase de CypA (Zydowsky et al., 1992). La séquestration du VIH-1 a donc été étudiée lors de l'inhibition de cette l'interaction par la CsA ainsi que par la mutation H436Q. En présence de MG132, les cellules MDTF exprimant TRIMCyp sauvage ou TRIMCyp mutant ont été traitées ou non à la CsA et infectées par le VIH-1 pendant 6 heures. En présence de CsA, les corps cytoplasmiques de TRIMCyp sauvage et de TRIMCyp mutant ont une taille plus grande. De plus, la CsA n'a aucun effet sur le nombre de colocalisation entre TRIMCyp sauvage et la capside viral du VIH-

1, de même que sur le nombre de colocalisation entre TRIMCyp H436Q et la capside du VIH-1 (Figure 3.5).

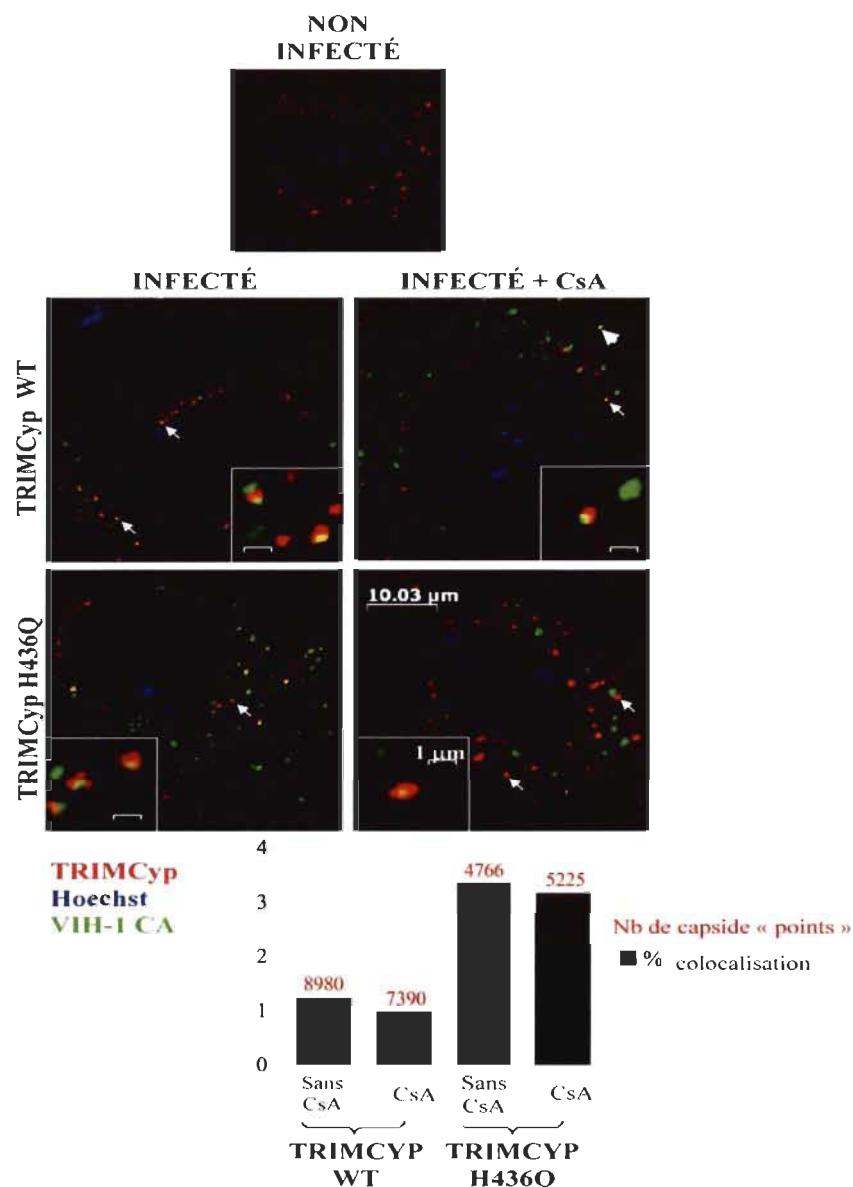


FIGURE 3.5 : Effet de la CsA et de la mutation H436Q sur la séquestration virale par TRIMCyp. Cellules MDTF exprimant TRIMCyp sauvage ou TRIMCyp H436Q infectées par le VIH-1 en présence ou non de CsA. Les noyaux sont représentés en bleu, la capside virale est indiquée en vert et TRIMCyp en rouge. Chaque point vert a été comptabilisé comme étant un seul virus. Les flèches montrent des exemples de colocalisation. Le graphique indique le pourcentage de colocalisation pour chaque condition ainsi qu'en rouge le nombre de capside comptabilisé.

3.4 Conclusions

L'objectif de cette étude était donc d'étudier la multimérisation de TRIM5 α et TRIMCyp pour la formation des corps cytoplasmiques ainsi que la séquestration du VIH-1 dans ces structures. Les résultats ont montré que TRIM5 α présente les formes dimériques, trimériques, hexamériques ainsi que multimériques. Il est difficile de révéler les complexes de hauts poids moléculaires sur les gels d'acrylamide. De plus, il n'est pas exclu que l'épitope Flag en C-terminal de TRIM5 α puisse interférer avec la multimérisation de la protéine. Pour vérifier si l'épitope FLAG interfère avec la multimérisation de TRIM5 α , une expérience complémentaire utilisant TRIM5 α endogène pourrait être réalisée. Le même protocole pourrait être utilisé en changeant deux éléments. Cette fois des cellules de Singe Rhésus serait employées, celles-ci contiennent un TRIM5 α rh endogène, puis l'anti-corps primaire Anti-FLAG serait remplacé par un anticorps primaire Anti-TRIM5 α . Il n'est pas confirmé ici que les multimères sont composés uniquement de protéines TRIM5 α parce que son niveau d'expression est bas. Il n'est pas possible pour l'instant de produire les expériences biochimiques nécessaires pour déterminer la composition des multimères. Par contre, il serait intéressant de voir si TRIM5 α purifié a le même patron de multimérisation. Un article récemment publié a permis la purification de TRIM5Cyp (Pertel T. et al., 2011). Ils ont purifié TRIMCyp du Singe hiboux en le clonant dans le vecteur MultiBac. Ils ont exprimé TRIMCyp-taggé dans des cellules d'insectes en les infectant avec des baculovirus qui contiennent le gène. Les cellules d'insectes ont ensuite été lysées puis TRIMCYP a été purifiées sur une colonne Superdex 200 (GE Healthcare). Bien que la bande ait la taille de l'hexamère, un trimère de TRIM5 α pourrait être lié à une autre protéine. S'il s'avérait que TRIM5 α est couplé à une autre protéine, il serait intéressant d'étudier l'effet de celle-ci sur la séquestration virale. En utilisant l'ARN interférence, il serait possible de diminuer l'expression du gène codant pour cette protéine. Cependant, le modèle de l'hexamère de TRIM5 α semble plausible puisque la capsid virale est elle-même constituée d'hexamères. De

plus, la formation de multimères de faible poids moléculaire (dimères, trimères et hexamères) n'est pas influencée par le contact avec le virus soumis à restriction. Cependant, il est possible que des multimères de haut poids moléculaire soient modulés par l'infection virale. Nos résultats montrent donc que le patron de multimérisation de TRIM5 α est complexe. Ensuite, l'étude de la séquestration virale par TRIM5 α montre que la CsA influence la grosseur et le nombre de corps cytoplasmique mais qu'elle n'a aucun effet sur la multimérisation de TRIM5 α et la colocalisation de TRIM5 α et du virus. Par contre, le MG132 augmente le nombre de colocalisation et la taille du virus. La séquestration du virus VIH-1 par TRIMCyp peut se produire en absence de restriction.

BIBLIOGRAPHIE

Anderson J. L., C.E.M., Wu X., Vandegraaff N., Engelman A., and Hope T. J., *Proteasome Inhibition Reveals That a Functional Preintegration Complex Intermediate can be Generated During Restriction by Diverse TRIM5 Proteins*. Journal of Virology, 2006. **80**(19): p. 9754-9760.

Asaoka K., I.K., Hishinuma T., Horie-Inoue K., Takeda S., and Inoue S., *A Retrovirus Restriction Factor TRIM5 α is Transcriptionally Regulated by Interferons*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **338**: p. 1950-1956.

Avela k., Lipsanen-Nyman M., Idanheimo N., Seemanova E., Rosengren S., Makela T. P., Perheentupa J., Chapelle A., and Lehesjoki A. E., *Gene encoding a new RING-B-box-coiled-coil protein is mutated in mulibrey nanism*. Nature Genet, 2000. **25** :p. 298-301.

Berthoux L., S.S., Sokolskaja E., and Luban J., *Cyclophilin A is Required for TRIM5 α -Mediated Resistance to HIV-1 in Old World Monkey Cells*. Proc. of National Academy of Sciences, 2005. **102**(41): p. 14849-14853.

Besnier C., Y.L., Strange B., Lister A., Takeuchi Y., Goff S. P., and Towers G. J., *Characterization of Murine Leukemia Virus Restriction in Mammals*. Journal of Virology, 2003. **77**(24): p. 13403-13406.

Bieniasz, P.D., *Restriction factors: a defense against retroviral infection*. Elsevier, 2003. **11**(6): p. 286-291.

Borden K. L., Boddy M. N., Lally J., O'Reilly N. J., Martin S., Howe K., Solomon E., Freemont P. S., *The solution structure of the RING finger domain from the acute promyelocytic leukaemia proto-oncoprotein PML*. EMBO J, 1995. **14** : p.1532-1541.

Bosco D. A., E.E.Z., Pochapsky S., Sundquist W. I., and Kern D., *Catalysis of Cis/Trans Isomerization in Native HIV-1 Capsid by Human Cyclophilin A*. Proc. of National Academy of Sciences, 2002. **99**(8): p. 5247-5252.

Brennan G., K.Y., Kodaman T., and Hu S-L, *Novel TRIM5 Isoforms Expressed by Macaca nemestrina*. Journal of Virology, 2007. **81**(22): p. 12210-12217.

Brennan G., K.Y., and Hu S-L., *TRIMCyp Expression in Old World Primates Macaca nemestrina and Macaca fascicularis*. Proc. of National Academy of Sciences, 2008. **105**(9): p. 3569-3574.

Brunner L. S., Smeltzer S.C., Bare B., and Suddarth D. S. (2006), De Boeck University, Bruxelles, Belgique, 392p.

C. elegans Sequencing Consortium, *Genome sequence of the nematode C. elegans : a platform for investigating biology*. Science, 1998. **282** : p. 2012-2018.

Campbel E. M., D.M.P., Yap M. W., Wu X., Gallois-Montbrun S., Malim M. H., Stoye J. P., and Hope T. J., *TRIM5 α Cytoplasmic Bodies are Highly Dynamic Structures*. Molecular Biology of the Cell, 2007. **18**: p. 2102-2111.

Campbell E. M., P.O., Anderson J. L., and Hope T. J., *Visualization of a Proteasome-Independent Intermediate During Restriction of HIV-1 by Rhesus TRIM5 α* . The Journal of Cell Biology, 2008. **180**(3): p. 549-561.

Cao T., Borden K. L., Freemont P. S., Etkin L. D., *Involvement of the rfp tripartite motif in protein-protein interactions and subcellular distribution*. J Cell Sci., 1997. **110** : p. 1563-1571.

Carthagena L., B.A., Luna J. M., David A., Urchil P. D., Margottin-Goguet F., Mothes W., Hazan U., Transy C., and Pancino G., *Human TRIM Gene Expression in Response to Interferons*. PLoS Pathogens, 2009. **4**(3).

Carthagen L., P.M.C., Ringard M., Chelbi-Alix M. K., Hazan U., and Nisole S., *Implication of TRIMalpha and TRIMCyp in Interferon-Induced Anti-Retroviral Restriction Activities*. Retrovirology, 2008. **5**(59).

Chatterji U., B.M.D., Gaskill P., Sheeter D., Fox H., and Gallay P. A., *TRIM5 α Accelerates Degradation of Cytosolic Capsid Associated with Productive HIV-1 Entry*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(48): p. 37025-37033.

DeFranco A. L., Robertson M., and Locksley R. M., (2009) "Immunité : La réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires", De Boeck University, Bruxelles, Belgique, 400p.

De Robertis E. M. F., Lemonde A., and Delisle C. (1983) "Biologie cellulaire et moléculaire", Presse université Laval, 758p.

Diaz-Griffero F., V.N., Li Y., McGee-Estrada K., Stremlau M., Welikala S., Si Z., Engelman A., and Sodroski J., *Requirements for Capsid-Binding and an Effector Function in TRIMCyp-Mediated Restriction of HIV-1*. Virology, 2006a. **351**: p. 404-419.

Diaz-Griffero F., K.A., Perron M., Xiang S-H., Javanbakht H., Li X., and Joseph Sodroski, *Modulation of Retroviral Restriction and Proteasome Inhibitor-Resistant Turnover by Changes in the TRIM5 α B-Box 2 Domain*. Journal of Virology, 2007a. **81**(19): p. 10362-10378.

Diaz-Griffero F., K.A., Lee M., Stremlau M., Poeschla E., and Sodroski J., *Comparative Requirements for the Restriction of Retrovirus Infection by TRIM5 α and TRIMCyp*. Virology, 2007b. **369**: p. 400-410.

Diaz-Griffero F., L.X., Javanbakht H., Song B., Welikala S., Stremlau M., and Sodroski J., *Rapid Turnover and Polyubiquitylation of the Retroviral Restriction Factor TRIM5*. Virology, 2006b. **349**: p. 300-315.

Diaz-Griffero F., V.N., Li Y., McGee-Estrada K., Stremlau M., Welikala S., Si Z., Engelman A., and Sodroski J., *Requirements for Capsid-Binding and an Effector*

Function in TRIMCyp-Mediated Restriction of HIV-1. Virology, 2006a. **351**: p. 404-419.

Disco. (2009) "Épidémiologie des virus de l'immunodéficience humaine (VIH)"
Uniform Ressource Locator http://dicos.ens-lyon.fr/vie/viro/XML/db/bio/viro/metadata/LOM_V05_2B1_HIV_Epidemio.b.xml.

Dorfman T., Weimann A., Borsetti A., Walsh C.T., and Göttlinger H.G. *Active-site residues of cyclophilin A are crucial for its incorporation into human immunodeficiency virus type 1 virions*. Journal of Virology, 1997, **71**(9): p. 7110-7113.

Emerman M., *How TRIM5 α Defends Against Retroviral Invasions*. Proc. of National Academy of Sciences, 2006. **103**(14): p. 5249-5250.

Forshey B. M., v.S.U., Sundquist W. I., and Aiken C., *Formation of a Human Immunodeficiency Virus Type 1 Core of Optimal Stability Is Crucial for Viral Replication*. Journal of Virology, 2002. **76**(11): p. 5667-5677.

Freemont P.S., *Ring for destruction?* Cur. Biol., 2000, **102**: p.R84-R87.

Ganser-Pomillos B. K., Cheng A., and Yeager M., *Structure of Full-Length HIV-1 CA:A Model for the Mature Capsid Lattice*. Cell, 2007. **131** : p.70-79.

Gao F., B.E., Robertson D. L., Chen Y., Rodenburg C. M., Michael S. F., Cummins L. B., Arthur L. O., Peeters M., Shaw G. M., Sharp P.M. and Hahn B. H., *Origin of HIV-1 in the Chimpanzee Pan troglodytes troglodytes*. Nature, 1999. **397**: p. 436-441.

Gamble T. R., Vajdos F. F., Yoo S., Worthylake D. K., Houseweart M., Sundquist W. I., and Hill C. P. *Crystal Structure of Human Cyclophilin A Bound to the Amino-Terminal Domain of HIV-1 Capsid*. Cell, 1996. **87** : p.1285-1294.

Goff, S. P. (2004). "Genetic control of retrovirus susceptibility in mammalian cells." *Annu Rev Genet* **38**: p.61-85.

Goffinet C, Allespach I, Homann S, Tervo HM, Habermann A, et al. *HIV-1 antagonism of CD317 is species specific and involves Vpu-mediated proteasomal degradation of the restriction factor*. *Cell Host Microbe*, 2009. **5**: 285–297.

Gothel S. F. And Marahiel M. A. *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts*. *Cell Mol Life Sci*, 1999, **55**: p.423-436.

Grignani F., Fagioli M., Alcalay M., Longo L., Pandolfi P. P., Donti E., Biondi A., Lo Coco F., and Pelicci P. G., *Acute promyelocytic leukemia : from genetics to treatment*. *Blood*, 1994. **83** : p.10-25.

Hofmann W., S.D., Labonte J., Munson L., Gibson S., Scammell J., Ferrigno P., and Sodroski J., *Species-Specific, Postentry Barriers to Primate Immunodeficiency Virus Infection*. *Journal of Virology*, 1999. **73**(12): p. 10020-10028.

Horn E.J., Albor A., Liu Y., El-Hizawi S., Vanderbeek G.E., Badcock M., Bowden G.T., Hennings H., Lozano G., Weinberg W.C. and Kulesz-Martin M., *Ring protein Trim32 associated with skin carcinogenesis has anti-apoptotic and E3-ubiquitin ligase properties*. *Carcinogenesis*, 2004. **25** :p.157-167.

Huraux J., Nicolas J., Agut H. et Peigue-Lafeuille H., *Traité de Virologie Médicale*. The Boek Diffusion, 2003, 703 pages

James L. C., K.A.H., Khan Z., Rhodes D. A., and Trowsdale J., *Structural Basis for PRYSPRY-Mediated Tripartite Motif (TRIM) Protein Function*. *Proc. of National Academy of Sciences*, 2007. **104**(15): p. 6200-6205.

Janeway C. A., Travers P., Duveli G., and Masson P. L. (2003) "Immunologie", De Boeck University, Bruxelles, Belgique, 782p.

Javanbakht H., Y.W., Yeung D. F., Song B., Diaz-Griffero F., Li Y., Li X., Stremlau M., and Sodroski J., *Characterization of TRIM5 α Trimerization and its Contribution to Human Immunodeficiency Virus Capsid Binding*. Virology, 2006. **353**: p. 234-246.

Javanbakht H., D.-G.F., Stremlau M., and Si Z., *The Contribution of RING and B-box 2 Domains to Retroviral Restriction Mediated by Monkey TRIM5 α* . The Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(29): p. 26933-26940.

Joazeiro C.A. et Weissman A.M., *RING finger proteins : mediators of ubiquitin ligase activity*. Cell. 2000, **102**: p.549-552.

Keckesova Z., Y.L.M.J., and Towers G. J., *The Human and African Green Monkey TRIM5 α Genes Encode Ref1 and Lv1 Retroviral Restriction Factor Activites*. Proc. of National Academy of Sciences, 2004. **101**(29): p. 10780-10785.

Lech P., a.S.N.V., *Isolation and Characterization of Human Cells Resistant to Retrovirus Infection*. Retrovirology, 2007. **4**(45).

Le Douarin B., Zechel C., Garnier J. M., Lutz Y., Tora L., Pierrat P., Heery D., Gronemeyer H., Chambon P., Losson R., *The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18*. EMBO J, 1995. **14** : p.2020-2033.

Lemey P., P.O.G., Wang B., Saksena N. K., Salemi M., and Vandamme A-M., *Tracing the Origin and History of the HIV-2 Epidemic*. Proc. of National Academy of Sciences, 2003. **100**(11): p. 6588-6592.

Levin J. G. (2009) "Section on viral gene regulation", Uniform Ressource Locator <http://svgr.nichd.nih.gov/research.html>.

Levy, J. A. (2007) "HIV and the pathogenesis of AIDS", ASM Press, Washington, D.C., U. S. A., 644 p.

Li L., Olvera J. M., Yoder K. E., Mitchell R. S., Butler S. L., Lieber M., Martin S.L., and Bushman F. D., *Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection*. The EMBO Journal, 2001. **20** : p.3272-3281.

Li X., a.S.J., *The TRIM5 α B-Box 2 Domain Promotes Cooperative Binding to the Retroviral Capsid by Mediating Higher-Order Self-Association*. Journal of Virology, 2008. **82**(23): p. 11495-11502.

Li X., G.B., O'hUigin C., Diaz-Griffero F., Song B., Si Z., Li Y., Yuan W., Stremlau M., Mische C., Javanbakht H., Scally M, Winkler C., Dean M., and Sodroski J., *Unique Features of TRIM5 α Among Closely Related Human TRIM Family Members*. Virology, 2007. **360**: p. 419-433.

Luban, J., *Cyclophilin A, TRIM5, and Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection*. Journal of Virology, 2007. **81**(3): p. 1054-1061.

Maillard P. V., R.S., Serhan F., Turelli P., and Trono D., *Interfering Residues Narrow the Spectrum of MLV Restriction by Human TRIM5 α* . PLoS Pathogens, 2007. **3**(12): p. 2052-2062.

Malim, M.H., *APOBEC Proteins and Intrinsic Resistance to HIV-1 Infection*. Phil. Trans. R. Soc. B, 2009. **364**: p. 675-687.

McNatt M. W., Z.T., Hatzioannou T., Bartlett M., Ben Fofana I., Johnson W. E., Neil S. J. D., and Bieniasz P.D., *Species-Specific Activity of HIV-1 Vpu and Positive Selection of Tetherin Transmembrane Domain Variant*. PLoS Pathogens, 2009. **5**(2).

Micha Nethe, B.B.a.A.C.v.d.K., *Retroviral superinfection resistance*. Retrovirology, 2005. **2**(52).

Mische C. C., J.H., Song B., Diaz-Griffero F., Stremlau M., Strack B., Si Z., and Sodroski J., *Retroviral Restriction Factor TRIM5 α Is a Trimer*. Journal of Virology, 2005. **79**(22): p. 14446-14450.

Miyamoto K., Nakamura N., Kashiwagi M., Honda S., Kato A., Hasegawa S., Takei Y., and Hirose S., *RING finger, B-box, and coiled-coil (RBCC) protein expression in branchial epithelial cells of Japanese eel, Anguilla japonica*. Eur J. Biochem, 2002. **269** : p.6152-6161.

Moussard C., and Mougin C. (2005) "Biologie moléculaire Biochimie des communications cellulaires", De Boeck University, Bruxelles, Belgique, 328p.

National Cancer Institute (2009) "HIV Drugs Resistance Program" Uniform Ressource Locator http://home.ncifcrf.gov/hivdrp/Pathak_res.html.

NCBI. (2008) "Genomic context", Uniform Resource Locator [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=85363&log\\$=databasead&logdbfrom=protein](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=85363&log$=databasead&logdbfrom=protein)

Neil S. J. D., Z.T., and Bieniasz P. D., *Tetherin Inhibits Retrovirus Release and is Antagonized by HIV-1 Vpu*. Nature, 2008. **451**: p. 425-431.

Nisole S., S.J.P., and Saïd A., *TRIM Family Proteins: Retroviral Restriction and Antiviral Defence*. Nature, 2005. **3**: p. 799-808.

Onusida. (2005) "Une épidémie en progression constante", Uniform Ressource Locator www.aidh.org/sante/images/carte_sida2005.gif.

Owens C.M., Yang P.C., Gottlinger H., Sodroski J., *Human and simian immunodeficiency virus capsid proteins are major viral determinants of early , postentry replication blocks in simian cells*. Journal of Virology, 2003, **77**(1): p. 726-731

Owens C.M. , Song B., Perron M.J., Yang P.C., Stremlau M., Sodroski J., *Binding and susceptibility to postentry restriction factors in monkey cells are specified by distinct regions of the human immunodeficiency virus type 1 capsid*. Journal of virology, 2004, **78**(10): p.5423-5437.

Passerini L. D., K.Z., and Towers G.J., *Retroviral restriction factors Fv1 and TRIM5 α act independently and can compete for incoming virus before reverse transcription*. Journal of Virology, 2006. **80**(5): p. 2100-2105.

Peng H., Begg G. E., Schultz D. C., Friedman J. R., Jensen D. E., Speicher D. W., Rauscher F. J. 3rd., *Reconstitution of the KRAB-KAP-1 repressor complex: a model system for defining the molecular anatomy of RING-B box-coiled-coil domain-mediated protein-protein interactions*. J. Mol. Biol., 2000. **295** : p.1139-1162.

Perron M. J., S.M., Lee M., Javanbakht H., Song B., and Sodroski J., *The Human TRIM5 α Restriction Factor Mediates Accelerated Uncoating of the N-Tropic Murine Leukemia Virus Capsid*. Journal of Virology, 2007. **81**(5): p. 2138-2148.

Pertel T., Hausmann S., Morger D., Züger S., Guerra J., Lascano J., Reinhard C., Santoni F.A., Uchil P.D., Chatel L., Bisiaux A., Albert M.L., Strambio-De-Castillia C., Mothes W., Pizzato M., Grütter M.G., and Luban J., *TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice*. Nature., 2011. **472**: p.361-365.

Pineda M. J., O.B.R., and Overbaugh J, *A TRIM5 α -Independent Post-Entry Restriction to HIV-1 Infection of Macaque Cells that is Dependent on the Path of Entry*. Virology, 2007. **363**: p. 310-318.

Perez-Caballero D., H.T., Yang A., Cowan S., and Bieniasz P.D., *Human Tripartite Motif 5 α Domains Responsible for Retrovirus Restriction Activity and Specificity*. Journal of Virology, 2005. **79**(14): p. 8969-8978.

Quaderi N. A., Schweiger S., Gaudenz K., Franco B., Rugarli E. I., Berger W., Feldman G. J., Volta M., Andolfi G., Gilgenkrantz S., Marion R. W., Hennekam R. C., Opitz J. M., Muenke M., Ropers H. H., Ballabio A., *Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22*. Nature Genet, 1997. **17** : p.285-291.

Reddy B. A., Etkin L. D., and Freemont P. S., *A novel zinc finger coiled-coil domain in a family of nuclear proteins*. Trends Biochem Sci (1992) **17**: p.344-345

Reeves J. D. and Doms R.W., *Human Immunodeficiency Virus Type 2*. Journal of General Virology, 2002. **83**: p. 1253-1265.

Reymond A., M.G., Fantozzi A., Merla G., Cairo S., Luzi L., Riganelli D., Zanaria E., Messali S., Cainarca S., Guffanti A., Minucci S., Pelicci P. G., and Ballabio A., *The Tripartite Motif Family Identifies Cell Compartments*. The EMBO Journal, 2001. **20**(9): p. 2140-2151.

Ritu Goila-Gaur, a.K.S., *HIV-1 Vif, APOBEC, and Intrinsic Immunity*. Retrovirology, 2008. **5**(51).

Rold C. J., a.A.C., *Proteasomal Degradation of TRIM5 α during Retrovirus Restriction*. PLoS Pathogens, 2008. **4**(5).

Saenz D. T., T.W., Olsen J. C., and Poeschla E. M., *Restriction of Feline Immunodeficiency Virus by Ref1, Lv1, and Primate TRIM5 α Proteins*. Journal of Virology, 2005. **79**(24): p. 15175-15188.

Sakuma R., M.A.A., and Ikeda Y., *Alpha Interferon Enhances TRIM5 α -Mediated Antiviral Activities in Human and Rhesus Monkey Cells*. Journal of Virology, 2007a. **81**(18): p. 10201-10206.

Sakuna R., N.J.A., Ohmine S. and Ikeda Y., *Rhesus Monkey TRIM5 α Restricts HIV-1 Production Through Rapid Degradation of Viral Gag Polyproteins*. Nature Medicine, 2007b. **13**(5): p. 631-635.

Sanao. (2007a) "Processus d'attachement du VIH" Uniform Ressource Locator http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:HIV_attachment_fr.png.

Sanao. (2007b) "Structure schématique du VIH sans libellé (avec une correction sur l'emplacement de la protéase)", Uniform Ressource Locator http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:VIH_sans_libel.png.

Sano. (2007) "Cycle de réplication du VIH sans libellé" Uniform Ressource Locator http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:HIV_gross_colored_fr_sans_libel.png.

Santé Canada. (2006) "VIH et sida", Uniform Ressource Locator <http://www.hc-sc.gc.ca/hc-ps/dc-ma/aids-sida-fra.php>.

Sawyer S. L., E.M., and Malik H. S., *Discordant Evolution of the Adjacent Antiretroviral Genes TRIM22 and TRIM5 in Mammals*. PLoS Pathogens, 2007. **3**(12): p. 1918-1929.

Sayah D. M., S.E., Berthoux L., and Luban J., *Cyclophilin A Retrotransposition into TRIM5 Explains Owl Monkey Resistance to HIV-1*. Nature, 2004. **430**: p. 569-573.

Sebastian S., S.E., and Luban J., *Arsenic Counteracts Human Immunodeficiency Virus Type 1 Restriction by Various TRIM5 Orthologues in a Cell Type-Dependent Manner*. Journal of Virology, 2006. **80**(4): p. 2051-2054.

Sebastian S., and Luban J., *TRIM5 α Selectively Binds a Restriction-Sensitive Retroviral Capsid*. Retrovirology, 2005. **2**(40).

Si Z., V.N., O'hUigin C., Song B., Yuan W., Xu C., Perron M., Li X., Marasco W. A., Engelman A., Dean M., and Sodroski J., *Evolution of a Cytoplasmic Tripartite Motif (TRIM) Protein in Cows that Restricts Retroviral Infection*. Proc. of National Academy of Sciences, 2006. **103**(19): p. 7454-7459.

Simon V., H.D.D., and Karim Q. A., *HIV/AIDS Epidemiology, Pathogenesis, Prevention, and Treatment*. Lancet, 2006. **368**: p. 489-504.

Sokolskaja E, and Luban J., *Cyclophilin, TRIM5, and Innate Immunity to HIV-1*. Current Opinion in Microbiology, 2006. **9**: p. 404-408.

Sokolskaja E., Sayah D. M., and Luban J., *Target Cell Cyclophilin A Modulates Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity*. Journal of Virology, 2004. **78** : p.12800-12808.

Song B., G.B., O'hUigin C., Javanbakht H., Li X., Stremlau M., Winker C., Dean M., and Sodroski J., *The B30.2(SPRY) Domain of the Retroviral Restriction Factor TRIM5 α Exhibits Lineage-Specific Length and Sequence Variation in Primates* Journal of Virology, 2005a. **79**(10): p. 6111-6121.

Song B., J.H., Perron M., Park D. H., Stremlau M., and Sodroski J., *Retrovirus Restriction by TRIM5 α Variants from Old World and New World Primates*. Journal of Virology, 2005b. **79**(7): p. 3930-3937.

Song B., Diaz-Griffero F., Park D. H., Rogers T., Stremlau M., and Sodroski J., *TRIM5 α association with cytoplasmic bodies is not required for antiretroviral activity*. Virology, 2005c. **343** :p. 201-211.

SP, G., *Genetic control of retrovirus susceptibility in mammalian cells*. Annual Review of Genetics, 2004. **38**: p. 61-85.

Stremlau M., O.C.M., Perron M. J., Kiessling M., Autissier P., and Sodroski J., *The Cytoplasmic Body Component TRIM5 α Restricts HIV-1 Infection in Old World Monkeys*. Nature, 2004. **427**: p. 848-853.

Stremlau M., P.M., Lee M., Li Y., Song B., Javanbakht H., Diaz-Griffero F., Anderson D. J., Sundquist W. I., and Sodroski J., *Specific Recognition and Accelerated Uncoating of Retroviral Capsids by the TRIM5 α Restriction Factor*. Proc. of National Academy of Sciences, 2006.

Takahashi M., Inaguma Y., Hiai H., and Hirose F., *Developmentally regulated expression of a human finger-containing gene encoded by the 5' half of the ret transforming gene*. Mol. Cell. Biol, 1988. **8** : p. 1853-1856.

Takeuchi H., a.M.T., *Host Factors Involved in Resistance to Retroviral Infection*. Microbiology and Immunology, 2008. **52**: p. 318-325.

The French FMF Consortium, *A candidate gene for familial Mediterranean fever*. Nature Genet, 1997. **17** : p. 25-31.

The International FMF Consortium, *Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever*. Cell, 1997. **90** : p.797-807.

Tissot C., Mechti N., *Molecular cloning of a new interferon-induced factor that represses human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat expression*. J. Biol. Chem., 1995. **270** : p. 14891-14898.

Towers G.J., Hatzioannou T., Cowan S., Goff S.P., Luban J., Bieniasz P.D., *Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors*. Nature med., 2003. **9**: p.1138-1143.

Towers, G.J., *The Control of Viral Infection by Tripartite Motif Proteins and Cyclophilin A*. Retrovirology, 2007. **4**(40).

Trockenbacher A., Suckow V., Foerster J., Winter J., Krauss S., Ropers H.H., Schneider R. And Schweiger S., *MID1, mutated in Opitzsyndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation*. Nature Genet, 2001. **29**: p.287-294

Uchil P. D., Quinlan B. D., Chan W-T, Luna J. M., and Mothes W., *TRIM E3 Ligases Interfere with Early and Late Stages of the Retroviral Life Cycle*. PLoS Pathog, 2008. **4**(2) :e16

Urano T., Saito T., Tsukui T., Fujita M., Hosoi T., Muramatsu M., Ouchi Y. and Inoue S., *Efp targets 14-3-3 for proteolysis and promotes breast tumor growth*. Nature, 2002. **417**: p.871-875.

Varthakavi V., S.R.M., Bour S. P., Strebel K., and Spearman P., *Viral Protein U Counteracts a Human Host Cell Restriction that Inhibits HIV-1 Particle Production*. Proc. of National Academy of Sciences, 2003. **100**(25): p. 15154-15159.

Vichi A., Payne D.M., Pacheno-Rodriguez G., Moss J., and Vaughan M. *E3 ubiquitin ligase activity of the trifunctional ARD1 (ADP-ribosylation factor domain protein 1)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005. **102**: p.1945-1950

Virgen C.A., K.Z., Bieniasz P.D., and Hatzioannou T., *Independent Genesis of Chimeric TRIM5-Cyclophilin Proteins in Two Primate Species*. Proc. of National Academy of Sciences, 2008. **105**(9): p. 3563-3568.

Wada K. And Kamitani T., *Autoantigen R052 is an E3 ubiquitin ligase*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(1): p.415-421.

Wilson S. J., W.B.L.J., Maplanka C., Newman R. M., Verschoor E. J., Heeney J. L., and Towers G. J., *Rhesus Macaque TRIM5 Alleles Have Divergent Antiretroviral Specificities*. Journal of Virology, 2008a. **82**(14): p. 7243-7247.

Wilson S. J., W.B.L.J., Ylinen L. M. J., Verschoor E., and Heeney J. L., *Independent Evolution of an Antiviral TRIMCyp in Rhesus Macaques*. Proc. of National Academy of Sciences, 2008b. **105**(9): p. 3557-3562.

Wu X., A.J.L., Campbell E. M., Joseph A. M., and Hope T. J., *Proteasome Inhibitors Uncouple Rhesus TRIM5 α Restriction of HIV-1 Reverse Transcription and Infection*. Proc. of National Academy of Sciences, 2006. **103**(19): p. 7465-7470.

Xu L., Yang L., Moitra P.K., Hashimoto K., Rallabhandi P., Kaul S., Meroni G., Jensen J.P., Weissman A.M. and D'Arpa P., *BTBD2 colocalize to cytoplasmic bodies with the RBCC/tripartite motif protein, TRIM5 δ* . Exp Cell Res, 2003. **288**: p.84-93.

Yamauchi K., W.K., Tanji K., Tanaka M., and Kamitani T., *Ubiquitination of E3 Ubiquitin Ligase TRIM5 α and its Potential Role*. the FEBS Journal, 2008. **275**: p. 1540-1555.

Yap M. W., N.S.a.S.J.P., *A Single Amino Acid Change in the SPRY Domain of Human TRIM5 α Leads to HIV-1 Restriction*. Current Biology, 2005. **75**: p. 73-78.

Yap M. W., Nisole S., Lynch C., Stoye J.P., *Trim5alpha protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004. **101** : p.10786-10791.

Yeh ETH, Gong L., and Kamitani T., *Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles*. Gene, 2000. **248**: p.1-14.

Zydowsky L.D., Etzkorn F.A., Chang H.Y., Ferguson S.B., Stolz L.A., Ho S.I., and Walsh C.T., *Active site mutants of human cyclophilin A separate peptidyl-prolyl isomerise activity from cyclosporine A binding and calcineurin inhibition*. Protein Sci., 1992. **1**(9): p. 1092-1099.